

# **Anthocyanhaltige Beerenextrakte und ihr Effekt auf das Wachstum von Darmbakterien und die Zusammensetzung der humanen Darm-Mikrobiota**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig Universität Gießen

vorgelegt von **Würdemann, Nora**  
aus Bremerhaven

Gießen, 2016

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des Fachbereiches Medizin der  
Justus-Liebig-Universität, Gießen

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Eugen Domann

Gutachterin: Prof. Dr. med. Elke Roeb

Tag der Disputation: 05.05.2017

Meinen Eltern und Großeltern

Eine Reise von tausend Meilen beginnt mit einem einzigen Schritt.

*Lao-tse* (4. Jahrhundert v. Chr.)

# **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung .....	1
1.1 Die humane Darm-Mikrobiota .....	1
1.2 Anthocyane.....	3
1.3 Aufgabenstellung .....	6
2. Materialien und Methoden .....	9
2.1 Materialien.....	9
2.2 Bakterienstämme.....	11
2.3 Medien und Anzuchtverfahren .....	13
2.4 Vorbereitung der anthocyanreichen Beerenextrakte .....	13
2.5 Wachstum der fakultativen Anaerobier in Abhängigkeit von Anthocyanen.....	14
2.5.1 Pipettierschemata .....	14
2.5.1.1 Wachstumsveränderung der Subspezies durch Zugabe von verschiedenen anthocyanreichen Beerenextrakten .....	14
2.5.1.2 Wachstumsveränderungen der Subspezies durch Zugabe von verschiedenen Anthocyan-Konzentrationen.....	15
2.6 Wachstum der fakultativen Anaerobier in Abhängigkeit von Mono- und Polysacchariden.....	17
2.6.1 Vorbereitung der Monosaccharid-Lösung.....	17
2.6.2 Pipettierschema: Wachstumsveränderung der Bakterien durch Zugabe von verschiedenen Monosacchariden .....	17
2.7 Bestimmung der optischen Dichte OD <sub>600nm</sub> .....	18
2.8 Entwicklung eines SOP zur Stuhlprobenverarbeitung .....	18
2.8.1 Extraktion der Stuhlproben.....	19
2.8.1.1 Aufbereitung der Stuhlproben.....	19
2.8.1.2 DNA-Extraktion .....	20
2.8.2 DNA-Vervielfältigung mittels Piko® Thermal Cycler .....	20
2.8.2.1 Vorbereitung der DNA-Proben .....	20
2.8.2.2 DNA-Vervielfältigung mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese.	21
2.8.3 Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC).....	22
2.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung .....	23
3. Ergebnisse .....	24
3.1 Wachstumsbeeinflussung einzelner Bakterienspezies durch anthocyanreiche Beerenextrakte.....	24
3.1.1 Charakterisierung des Wachstums der fakultativen Anaerobier anhand einiger ausgewählter Subspezies .....	25
3.1.1.1 Charakterisierung des Wachstums von <i>EHEC 1017</i> .....	27
3.1.1.2 Charakterisierung des Wachstums von <i>Enterococcus faecalis</i> V583...	30
3.1.1.3 Charakterisierung des Wachstums von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	34
3.1.2 Wachstumsbeeinflussung fakultativer Anaerobier mittels verschiedener Anthocyan-Konzentrationen .....	38

3.1.2.1 Charakterisierung des Wachstums von <i>EHEC 1017</i> .....	38
3.1.2.2 Charakterisierung des Wachstums von <i>Enterococcus faecalis</i> V583... ..	40
3.1.2.3 Charakterisierung des Wachstums von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	42
3.2 Beeinflussung der humanen Darm-Mikrobiota-Zusammensetzung durch anthocyanhaltige-Saftgabe.....	44
3.2.1 Betrachtung des Einflusses der anthocyanhaltigen-Säfte auf die Zusammensetzung der humanen Darm-Mikrobiota .....	45
3.2.2 Stuhlprobenprofile fünf ausgewählter Probandinnen .....	46
4. Diskussion.....	61
4.1 Analyse des Wachstumsverhaltens ausgewählter Bakterienspezies nach Zugabe von verschiedenen anthocyanreichen Beerenextrakten .....	62
4.2 Bewertung der Anthocyanwirkung auf die Zusammensetzung der menschlichen Darm-Mikrobiota .....	66
5. Zusammenfassung .....	72
6. Summary .....	73
7. Abkürzungsverzeichnis .....	74
8. Literaturverzeichnis .....	76
Anhang.....	81
Vorkommen von Anthocyanen in der Natur.....	81
Extrakt-Zusammensetzungen .....	86
Ernährungsprotokoll .....	90
Publikationen.....	93
Tecan-Schemata.....	95
Erklärung zur Dissertation .....	97
Danksagung .....	98

## 1. Einleitung

### 1.1 Die humane Darm-Mikrobiota

Der menschliche Gastrointestinaltrakt (GIT) stellt ein komplexes Organ dar, welches bei einer Größe von 200-300 m<sup>2</sup> ca.  $10^{13-14}$  Bakterien aus 1.000 verschiedenen Spezies beherbergt (1, 2). Die Entwicklung dieser Darm-Mikrobiota in ein derartig vielschichtiges Ökosystem findet hauptsächlich bis zum 4. Lebensjahr statt (3) und bleibt bis in die 7. Lebensdekade hinein relativ konstant (4). Schon während der Geburt beginnt die Besiedlung des bis hier hin noch sterilen Fötus sowohl durch Bakterien der Mutter als auch der Umgebung (3). Bereits jeder Säugling besitzt eine einzigartige, dynamische Darm-Mikrobiota die sich zu Beginn aus Entero- und Bifidobakterien zusammensetzt (5-8). Die endgültige Beschaffenheit wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Hierzu gehören der Genotyp und die Physiologie des Wirtes, die Besiedlungsgeschichte sowie einige Umweltfaktoren (3).

Laut Savage lässt sich die humane Darm-Mikrobiota zum einen in die autochthone (residente) und zum anderen in die allochthone (passagere) Darm-Mikrobiota unterteilen (1). Während es der autochthonen Darm-Mikrobiota bereits unter physikalischen Bedingungen möglich ist einzelne Lebensräume und Nischen des GIT zu besiedeln, ist die allochthone Darm-Mikrobiota hierzu weitgehend nur unter pathologischen Bedingungen in der Lage (9). In welchem Abschnitt des GIT sich die verschiedenen Bakterienspezies ansiedeln ist wiederum abhängig von verschiedenen Gegebenheiten. Der pH-Wert, die Peristaltik, das Redoxpotential, die bakterielle Adhäsion und Kooperation, die Mucinsekretion und das Nährstoffangebot sind nur einige wichtige Faktoren, die hierbei eine Rolle spielen. Da im oberen Abschnitt des GIT eine relativ rasche Peristaltik sowie ein niedriger pH-Wert herrschen, findet sich hier nur eine geringe Anzahl an Bakterien (ca.  $10^{3-4}$ /ml Inhalt). Die durch Säurefestigkeit bekannten Laktobazillen und Enterokokken stellen den größten Anteil dar. Erst im Ileum zeigt sich durch Abnahme der Peristaltik und des Säuregehaltes eine facettenreichere Darm-Mikrobiota mit höherer bakterieller Population ( $10^{7-8}$ /ml Inhalt), in der sich die Zusammensetzung des Kolons widerzuspiegeln beginnt. Basierend auf diesen Eigenschaften findet sich im distalen GIT die mit Abstand ausgeprägteste Kolonisation, wobei 99,9% der besiedelnden Bakterien durch Anaerobier repräsentiert werden (1, 10).

Laut Vrieze et al., die sich auf die 16S ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA)-Gen-Sequenzierungen beziehen, dominieren zum einen die Firmicutes, zu deren über 200 Gattungen unter anderem die Laktobazillen, Mykoplasmen, Bazillen und Clostridien zählen sowie die Bacteroides (ca. 20 Gattungen) und die Actinobakterien die humane

Darm-Mikrobiota (4, 11). Zu der subdominanten Gruppe der aeroben Bakterien gehören unter anderem die Enterobakterien (z. B. *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Proteus*) (12).

So komplex die Zusammensetzung der humanen Darm-Mikrobiota ist, so vielfältig sind auch ihre Aufgaben. Wie wichtig die Symbiose von Bakterien und Wirt für den Menschen ist, zeigt sich möglicherweise auch an einigen Tierversuchen, über die Shanahan berichtete. Die Tiere, welche keimfrei aufgezogen wurden, wiesen eine verminderte Vaskularisation, verminderte verdauliche enzymatische Aktivität, verringerte Muskelwanddicke, reduzierte Zytokinproduktion, verminderte Serumimmunglobulinlevel, kleinere Peyer-Plaques sowie weniger intraepitheliale Lymphozyten auf (13). Dies zeigt, dass die Darm-Mikrobiota unter anderem eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Immunsystems spielt.

Durch die autochthone Besetzung biologischer Nischen im GIT, die Konkurrenz um metabolische Substrate bzw. Rezeptoren und die Beeinflussung der Produktion von regulierenden Faktoren wie kurzkettiger Fettsäuren und Bacteriocinen wird die Ansiedlung exogener, pathogener Keime erschwert und schützt somit vor Erkrankung (1). Doch nicht nur die protektive Funktion steht im Vordergrund. Die Darm-Mikrobiota nimmt ergänzend Einfluss auf die Verstärkung der Barrieren (z. B. der Lipid-Zellmembran) zur luminalen Seite, die Induktion von IgA und das apikale Straffen von „tight junctions“ im parazellulären Raum. Ist diese Funktion gestört, spricht man auch vom „leaky gut“. Schädigende Substanzen wie Bakterien, Karzinogene oder Nahrungsmittel-Antigene können in diesem Fall ungehindert in das innere Milieu des Körpers übertreten und möglicherweise im Zusammenhang mit Erkrankungen wie Morbus Crohn und Zöliakie stehen (14, 15). Als weiteres großes Gebiet bleibt zum Schluss noch die metabolische Funktion des GIT zu nennen. Hierbei stehen die Absorption von Ionen, die Synthese von Vitaminen (Biotin, Folat, Vitamin K, etc.), die Verwertung von Energie (7), die Kontrolle der Zellproliferation und Zelldifferenzierung (16, 17), die Entwicklung des Immunsystems (18, 19), die Metabolisierung von Karzinogenen aus Nährstoffen sowie die Fermentation von unverdaulichen Nahrungsbestandteilen (12) im Vordergrund. Durch diese Komplexität wird deutlich, welchen fundamentalen Einfluss die Mehrheit dieser Mikroben auf die humane Physiologie und den menschlichen Metabolismus hat. Jedoch kann es aufgrund von verschiedenen Substanzen wie Antibiotika, Probiotika und Nahrungsbestandteilen (20-22) zu kurz- bzw. längerfristigen Modulationen der humanen Darm-Mikrobiota kommen. An dieser Veränderung der Zusammensetzung lassen sich sowohl positive Effekte wie z. B. der Rückgang von entzündlichen Darmkrankheiten (23) als auch Adipositas (24,



25) durch eine eventuell erhöhte Verstoffwechselung einzelner Nährstoffe als negativer Effekt ableiten. Dass bestimmtes Essen durch die Darm-Mikrobiota metabolisiert werden kann bzw. beinhaltende Bakterien die Zusammensetzung der menschlichen Darm-Mikrobiota verändern können und somit eine Förderung der generellen Gesundheit bewirken, wird mit Blick auf verschiedene Studien für immer wahrscheinlicher gehalten (26-28). Beispielhaft zu nennen sind hier die durch die Nahrung aufgenommenen Polyphenole. Sie stellen das Substrat für multiple Enzyme der humanen Darm-Mikrobiota dar, werden über diesen Weg umgewandelt und über den Darm absorbiert, um so ihre biologische Aktivität zu erlangen(2).

## 1.2 Anthocyane

Ein Vertreter dieser Polyphenole, deren potentiell positiver Effekt auf die Gesundheit durch einige Studien (29-31) bereits belegt wurde, sind die Anthocyane. Sie stellen eine Untergruppe der Flavonoide dar und sind für den größten Anteil an wasserlöslichen Farbpigmenten verantwortlich. Ihr Name leitet sich ab von den griechischen Worten *anthos*=Blüte und *kyanos*=blau. Abhängig von den Substituenten unterscheidet man die Aglykone, welche auch als Anthocyanidine bezeichnet werden, und die Glykoside (Anthocyanine). Das Grundgerüst (siehe Abb. 1.2-1), welches eine positive Ladung aufweist, besitzt an den Positionen 3 des C-Ringes und 5 des A-Ringes eine OH-Gruppe.

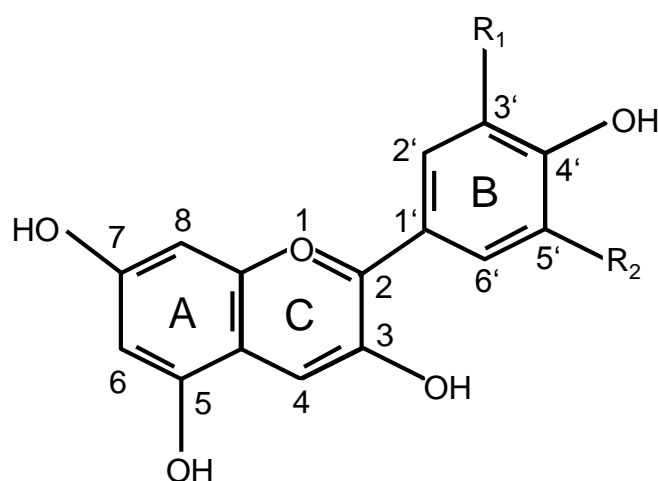


Abb. 1.2-1: Grundgerüst der Anthocyanidine

Die Glykosidierung dieser Gruppen spielt eine wesentliche Rolle in Bezug auf die Stabilität des Moleküls. Zu den möglichen Zuckern zählen Glucose, Galaktose, Arabinose und Rhamnose sowie Di- und Trisaccharide. Zusätzlich können auch

phenolische oder aliphatische Säuren eine Bindung mit dem Grundgerüst eingehen. Diverse Variationen zwischen den unterschiedlichen Substituenten führen zu mehreren hundert Strukturen in der Pflanzenwelt.

Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin und Petunidin sind die am häufigsten in der Natur vorkommenden Anthocyane (siehe Anhang „Vorkommen von Anthocyanen in der Natur“). Ihr Farbspektrum variiert von orange und rot (pH 1-3) über farblos (pH 4-6) bis zu blau-lila-schwarz (pH > 6) und unterliegt dem unterschiedlichen pH-Wert, der damit verbundenen Veränderung der Struktur der Anthocyane sowie komplex gebundenen Spurenelementen. Aufgrund der Farbvariation liegt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 465-560 nm. Anthocyane sind bevorzugt in der Epidermis bzw. Subepidermis von vielen Obst- (z.B. Beeren) und Gemüsesorten (z.B. Auberginen) zu finden (siehe Anhang „Vorkommen von Anthocyanen in der Natur“) und unter der Nummer E163 für die Färbung von Lebensmitteln zugelassen. In Deutschland werden im Durchschnitt täglich ca. 2,7 mg Anthocyane pro Person konsumiert (32), wovon, laut Angabe von Frau Dr. Sabine Kuntz (Ernährungswissenschaften, Justus-Liebig-Universität Gießen), ca. 10-100 µM das Kolon erreichen.

In einer Studie von McGhie wird gezeigt, dass bei Ratten schon einige Minuten nach der oralen Aufnahme Anthocyane im Plasma nachzuweisen waren (33). Auch wenn der Mechanismus zurzeit noch nicht bekannt ist, lässt dies möglicherweise darauf schließen, dass Anthocyane bereits durch die Magenwand aufgenommen werden (32, 34). In welchen Mengen dies geschieht, ist abhängig von der Anthocyan-Struktur. Da Aglykone und Metabolite im Plasma nicht zu finden waren, scheinen hier nur Anthocyanidine schnell und effizient absorbiert zu werden. Nach der Passage des Dünndarms wurden allerdings bei Ratten neben den Anthocyanidinen auch methylierte und glukuronidierte Derivate sowie Metabolite im Plasma, in der Galle und im Urin gefunden (34). Die meisten der aufgenommenen Anthocyane erreichen jedoch, trotz der genannten Stationen, glykolytisch das Kolon und unterliegen dort sowohl der mikrobiellen als auch der chemischen Degradierung durch den hohen pH-Wert (pH = 8) (35-37). Die bakterielle Metabolisierung beinhaltet unter anderem die Spaltung von glykosidischen Bindungen (35). Die hierbei entstandenen Anthocyanidine sind allerdings relativ instabil und zerfallen sehr schnell (38). Über eine pH-abhängige Strukturveränderung des Aglykons können laut Fleschhut et al. Phenolsäuren, Aldehyde sowie weitere bisher unbekannte Metabolite entstehen, die wiederum der Verstoffwechselung unterliegen (39). Basierend auf diesen Erkenntnissen scheinen Anthocyane in ihrer originären Form nur eine sehr geringe Bioverfügbarkeit zu

besitzen. Wu et al. haben ergänzend herausgefunden, dass Phenolsäuren nur 6,31 % der Metabolite aufgenommener Anthocyane ausmachen (40). Trotz dieser geringen Menge sind es nach derzeitigem Stand wohl die Anthocyan-Metabolite, wie Phenolsäuren etc., welche verantwortlich für die antioxidativen und diversen physiologischen Effekte sind. Durch unterschiedliche Studien wurde gezeigt, wie vielfältig dieser Effekt auf die Gesundheit des Menschen ist. Neben der antioxidativen (41, 42) und kardiovaskuloprotektiven (43, 44) Wirkung werden auch dem antikarzinogenen (45, 46) und antiphlogistischen Potenzial (36) eine hohe Bedeutung zugewiesen. Bakterien scheinen die Anthocyane aber nicht nur zu verstoffwechseln. Wie sich in einigen Studien zeigte, haben verschiedene Anthocyane oder deren Metabolite auch auf die Bakterien selbst einen Effekt. Krawitz et al. fanden heraus, dass Holunderbeer-Liquid-Extrakt einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum verschiedener Bakterienspezies und sogar Influenza-Viren hat. Gegenstand der Untersuchung waren hier verschiedene grampositive (*Streptococcus pyogenes*, *Streptokokken* der Gruppe C und G) sowie gramnegative (*Branhamella catarrhalis*) Bakterien, welche Infektionen des oberen Respirationstraktes hervorrufen können (47). Auch Cesoniene et al. zeigten, dass durch einen *Cranberry*-Extrakt eine große Anzahl humanpathogener Bakterien (*Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) im Wachstum gehemmt wurden (48).

### **Mikrobiomanalyse:**

Die zuvor beschriebene Testung einer Substanz (in diesem Fall anthocyanhaltige Beerenextrakte) an einzelnen Bakterien der humanen Mikrobiota stellt eine Möglichkeit dar, das Verhalten einzelner Spezies bzw. Subspezies genauer zu untersuchen. Aufwendiger ist jedoch die Untersuchung des kompletten humanen Mikrobioms (Gesamtheit aller Mikroorganismen, welche den Menschen besiedeln). Während früher die Anzüchtung einzelner Isolate zur Bestimmung einer Spezies notwendig war, besteht heute die Möglichkeit die Identifizierung anhand konservierter Genomabschnitte, z. B. der 16s rRNA, aus komplexen Proben durchzuführen. Diese Sequenzen, besitzen für jede Organismengruppe und einzelne Arten spezifische Merkmale und die unbekannten Proben können anhand der Sequenzdaten einem Stamm zugeordnet werden (49, 50). Zur Darstellung der Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota ist unter anderem die DHPLC-Analyse geeignet, welche auch dieser Arbeit als Methode gewählt wurde.

Um die gesundheitsfördernden Eigenschaften der Anthocyane in Verbindung mit der

humanen Darm-Mikrobiota bzw. des menschlichen Organismus genauer zu untersuchen, finanzierte das Ministerium für Bildung und Forschung das Projekt „Anthocyane in Fruchtsäften aus Beerenobst“. Untergliedert ist das Projekt in 7 Teilbereiche:

1. Entwicklung von Produkten mit Zusatznutzen (Functional Food) unter Berücksichtigung besonderer lebensmitteltechnologischer Methoden
2. Analytik von Anthocyanen und Metaboliten in Rohstoffen, Extrakten und biologischen Flüssigkeiten
3. Zusammensetzung der individuellen Stuhlflora und Fermentationseigenschaften ausgewählter Darmmikroben
4. Anthocyane und Metabolite – antioxidative und antiinflammatorische Wirksamkeit in vitro und in vivo
5. Bioverfügbarkeit und immunologische Wirkungen von Anthocyanen im Tiermodell
6. Bioverfügbarkeits- und Interventionsstudien beim Menschen
7. Verzehrsmuster und Darmflora im Kindesalter: DONALD Studie

Im Institut für Medizinische Mikrobiologie in Gießen befassten wir uns vorwiegend mit den Teilprojekten 3 und 6 (Probenverarbeitung). Die Teilprojekte 4 und 6 (Studienleitung und Probenkollektion) wurden am Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Gießen untersucht. Für das Unterprojekt 4 erfolgte die Verwendung des von uns etablierten Anzuchtverfahren der Bakterien und die Ergebnisse wurden bereits im Journal „Nutrients“ unter dem Titel „Inhibition of low-grade inflammation by anthocyanins after microbial fermentation in vitro“(51) publiziert (siehe Anhang).

### 1.3 Aufgabenstellung

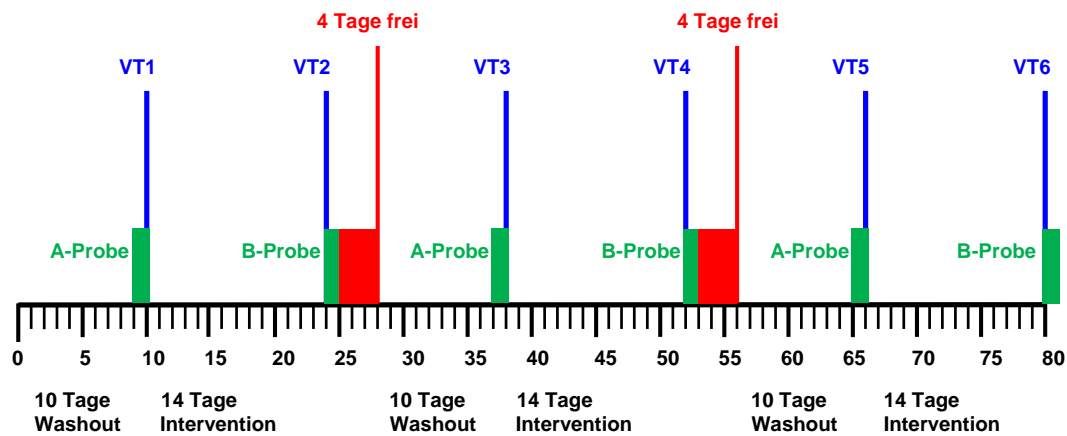
Der Fokus dieser Dissertation lag auf den Bakterien der humanen Darm-Mikrobiota und ihrem Verhalten in Wechselwirkung mit Anthocyanen. Im ersten Teil wurden zur Testung des Wachstumsverhaltens einige fakultative Anaerobier ausgewählt (siehe Tabelle 2.2-1) und mit verschiedenen anthocyanreichen Beerenextrakten in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt. Die Herstellung dieser aus der Forschungsanstalt für Weinanalytik und Getränkeforschung in Geisenheim stammenden Beerenextrakte erfolgte aus den Rebsorten Dakapo und Accent sowie aus Heidelbeeren. Ergänzend wurde ein 3,2 %iges Rubini-Holunderbeer-Liquid der Firma Berry-Pharma verwendet (siehe Anhang „Extrakt-Zusammensetzungen“). Eine daraufhin durchgeführte Inkubation über 24 Stunden im Flüssigmedium mit anschließender Bestimmung der optischen Dichte ( $OD_{600nm}$ ) bei 600 Nanometer sollte

Auskunft über einen inhibierenden/induzierenden sowie konzentrationsabhängigen Wachstumseffekt geben.

Ergänzend zum ersten Teil der Aufgabenstellung wurde im zweiten Teil untersucht, welchen Effekt anthocyanreiche Säfte auf die Zusammensetzung der humanen Darm-Mikrobiota haben. Hierzu sollte die Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Stuhlproben von 30 Probandinnen mit dem Maxwell isoliert, aufgereinigt und anschließend mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) durch den Piko Thermal Cyclor die DNA-Abschnitte, welche für die 16S rRNA codieren (16S rDNA), vervielfältigt werden. Dieser 16S rDNA-Bereich, welcher sowohl aus konservierten als auch aus variablen Regionen besteht, ist für jede bakterielle Spezies individuell (52). Die unterschiedliche Basenabfolge dieser variablen Regionen sollte ermöglichen, die entstandenen Proben durch eine anschließende *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC)-Analyse aufzutrennen und auszuwerten (53). Nach dieser standardisierten Aufarbeitung der Proben sollte analysiert werden, ob sich die Zusammensetzung der humanen Darm-Mikrobiota abhängig von einer anthocyanreichen Saft- und Smoothiegabe im Vergleich zu einer anthocyanarmen Placebogabe verändert hat.

Der Aufbau der Interventionsstudie zum Erhalt der Stuhlproben war wie folgt vorgegeben:

Die Probandinnen nahmen an einer 80-tägigen Interventionsstudie (siehe Abb. 1.3-1) teil und mussten an sechs Tagen Stuhlproben entnehmen. Den Versuchstagen 1, 3 und 5 ging jeweils eine 10-tägige *Washout*-Phase (Versuchstage eingeschlossen) voraus, an denen die Teilnehmerinnen sich an ein strenges Ernährungsprotokoll (siehe Anhang) halten mussten und keine Anthocyane oder Polyphenole konsumieren durften. Pro- oder Präbiotische Nahrungsmittel waren ebenfalls verboten, da hier eine Modulation der Darm-Mikrobiota zu erwarten gewesen wäre. Aufgabe der Probandinnen war, vor Beginn der Intervention eine Probe der letzten Stuhlprobe (A-Proben) zu entnehmen. Im folgenden 14-tägigen Interventionsabschnitt (Versuchstag 2, 4 und 6 eingeschlossen) musste jeden Morgen zum Frühstück 330 ml Heidelbeere-Dakapo-Saft, Smoothie oder Placebo (siehe Anhang „Extrakt-Zusammensetzungen“) konsumiert werden. Im Anschluss war es Aufgabe der Probandinnen, eine Probe des ersten Stuhls (B-Proben) nach Konsum des letzten Saftes zu entnehmen. Einer Einheit (10 Tage *Washout* und 14 Tage Saft-Intervention [incl. zwei Versuchstagen]) folgten immer vier freie Tage, an denen die Probandinnen keinen Ernährungseinschränkungen unterlagen (siehe Abb. 1.3-1).



**Abb. 1.3-1: Aufbau der Interventionsstudie**

Der 10-tägigen Washout-Phase (Versuchstage [VT] 1, 3 und 5 inklusive) folgte eine 14-tägige Interventions-Phase (VT 2, 4 und 6 inklusive), welcher sich wiederum vier freie Tage anschlossen. Die Entnahme der A-Probe erfolgte vor, die der B-Probe nach der jeweiligen Intervention.

## 2. Materialien und Methoden

### Steriles Arbeiten

Gemäß guter mikrobiologischer Praxis wurde, soweit erforderlich, steril unter der *Laminar flow* gearbeitet. Zur Verhinderung der Kontamination mit fremder DNA und unerwünschten Keimen wurden zusätzlich Handschuhe getragen.

### 2.1 Materialien

Während der Versuche kamen folgende Materialien im Reinheitsgrad „pro analysis“ zur Anwendung:

3,2 % Rubini-Holunderbeer-Liquid	BerryPharma (Leichlingen)
933F-Primer (10 bzw 100 pmol/μl)	Fisher Scientific (Schwerte)
1407R-Primer (10 bzw 100 pmol/μl)	Fisher Scientific (Schwerte)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Anthocyanreiche Beerenextrakte	Forschungsanstalt (Geisenheim)
BHI-Medium	Merck (Darmstadt)
Borsäure	Sigma (Deisenhofen)
Columbia Agar-Platte	Oxoid (Wesel)
D(+)-Glucose	Merck (Darmstadt)
D(-)-Fructose	Merck (Darmstadt)
EDTA-disodium	Serva (Heidelberg)
Ethidiumbromid	Eppendorf (Hamburg)
Ficoll (25 %)	MP Pharma (Freiburg)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Hermin	ServaElektrophoresis (Heidelberg)
LB-Medium	Becton, Dickinson (Heidelberg)
Maxwell® 16 LEV RNA Cartridge	Promega (Mannheim)
NaCl	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nukleasefreies Wasser	Promega (Mannheim)
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	Fisher Scientific (Schwerte)
Puffer A (0,1 M TEAA)	Transgenomic (Berlin)
Puffer B (0,1 M TEAA + 25 % Acetonitril)	Transgenomic (Berlin)
Puffer C = D (0,1 M TEAA + 75 % Acetonitril)	Transgenomic (Berlin)
TBE-Gel	Merck (Darmstadt)
Tris Puffer	Roth (Karlsruhe)
TSB-Medium	Merck (Darmstadt)

***Bereitstellung der anthocyanreichen Beerenextrakte:***

Die anthocyanreichen Beerenextrakte (Dakapo, Heidelbeere-Dakapo, Accent, Heidelbeere) wurden unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Helmut Dietrich (Forschungsanstalt Geisenheim, Weinanalytik und Getränkeforschung) zur Verfügung gestellt.

Weitere Angaben zu den einzelnen Extrakten und den angefertigten Stocklösungen sind im Anhang den „Extrakt-Zusammensetzungen“ zu entnehmen.

***Bereitstellung der Testgetränke:***

Der anthocyanreiche, ballaststoffarme Traube-Heidelbeer-Saft, der anthocyan- und ballaststoffreiche Traube-Heidelbeer-Smoothie und der anthocyan- und ballaststoffarme Traube-Heidelbeer-Placebosaft wurde ebenfalls im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Helmut Dietrich (Forschungsanstalt Geisenheim, Weinanalytik und Getränkeforschung) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung des Traubensaftes erfolgte aus den anthocyanreichen Sorten Dakapo und Accent und wurde im Verhältnis 80:20 mit Heidelbeerkonzentrat verschnitten. Die Herstellung des Smoothies erfolgte analog hierzu, wobei der Heidelbeer-Anteil püriert hinzugefügt wurde. Zur Placebo-Erstellung wurde das erste Eluat nach Gabe über eine Kronlab Pilot-Säule (20 cm Durchmesser), gefüllt mit 16 L SP 70 Harz (Resindion/Mitsubishi), abgefangen. Es erfolgte die Abfüllung in 330 ml Braunglasflaschen, welche im Anschluss, dunkel bei 4 °C, gelagert wurden.

***Bereitstellung der Stuhlproben/ Teilnahme von Probandinnen an der Interventionsstudie:***

Die Stuhlproben wurden unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Clemens Kunz (Institut für Ernährungswissenschaften, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung erfolgte im Rahmen einer Interventionsstudie mit 30 weiblichen Probandinnen zwischen 23-27 Jahren aus dem Bereich der Ernährungswissenschaften. Diese durften unter keinerlei Stoffwechselerkrankungen leiden oder in den letzten drei Monaten vor Studienbeginn Vitaminpräparate oder Medikamente zu sich genommen haben. Die Probandinnen wurden über die Studie sowie mögliche Risiken aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.

Die für diese Dissertation notwendigen Patientenversuche wurden mit Genehmigung der Ethik-Kommission unter dem Aktenzeichen 31/10 durchgeführt.



## 2.2 Bakterienstämme

Tab. 2.2-1: Übersicht zu den in den Versuchen verwendeten Bakterien, ihrer Herkunft sowie Angaben zum pathogenen Potential (54)

Bakterienstämme	Herkunft	Pathogenes Potential	Eigenschaften	Referenz (ggf. vorh.)
<b><i>Aeromonas hydrophila</i></b>	EDCC 5077, PI	Pathogen: Gastroenteritis, Fieber	Fakultativ anaerob	
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	EDCC 5405, PI	Pathogen: Gastroenteritis	Fakultativ anaerob	
<b><i>Citrobacter diversus</i></b>	EDCC 5081, PI	Pathogen: HWI, Bakteriämie	Fakultativ anaerob	
<b><i>Citrobacter freundii</i></b>	EDCC 5154, PI	Pathogen: HWI, Bakteriämie	Fakultativ anaerob	
<b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>	PI	Pathogen: HWI, Bakteriämie, Wundinfektion	Fakultativ anaerob	
<b><i>Enterobacter cloacae</i></b>	EDCC 5078, PI	Pathogen: HWI, Bakteriämie, Wundinfektion	Fakultativ anaerob	
<b><i>Enterobacter sakazakii</i></b>	EDCC 5274, PI	Pathogen: HWI, Bakteriämie, Gastroenteritis (Neugeborenes)	Fakultativ anaerob	
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	Eigene Stuhlprobe	Pathogen: HWI	Fakultativ anaerob	
<b><i>Enterococcus faecalis Symbioflor 1</i></b>	Symbio Pharm	Probiotisch	Fakultativ anaerob	(55)
<b><i>Enterococcus faecalis V583</i></b>	V583	Pathogen: HWI (VR)	Fakultativ anaerob	(56)
<b><i>Enterococcus faecium</i></b>	EDCC 5148, PI	Pathogen: HWI	Fakultativ anaerob	
<b><i>Escherichia coli</i></b>	PI	Pathogen: HWI, Bakteriämie, Gastroenteritis, Sepsis, Meningitis	Fakultativ anaerob	
<b><i>EHEC (O111:H8)</i></b>	1017 von L. Wiehler	Pathogen: Gastroenteritis, hämorrhagische Kollitis, hämolytische Anämie, Thrombocytopenie, HUS	Fakultativ anaerob	(57)
<b><i>EHEC (O26:H11)</i></b>	1018 von L. Wiehler	Pathogen: Gastroenteritis, hämorrhagische Kollitis, hämolytische Anämie, Thrombocytopenie, HUS	Fakultativ anaerob	(58)

<b>EHEC (O157:H7)</b>	1022 LS F. Gunzer	Pathogen: Gastroenteritis, hämorrhagische Kollitis, hämolytische Anämie, Thrombocytopenie, HUS	Fakultativ anaerob	(59)
<b>Hafnia alvei</b>	EDCC 5171, PI	Pathogen: Diarrhoe	Fakultativ anaerob	
<b>Klebsiella oxytoca</b>	PI	Pathogen: HWI, Wundinfektion	Fakultativ anaerob	
<b>Listeria monocytogenes (EGDe sequenziert)</b>	LMO 1052	Pathogen: Meningitis, Enzephalitis, febrile Gastroenteritis, Sepsis, Bakteriämie	Fakultativ anaerob	(60)
<b>Morganella morganii</b>	EDCC 5147, PI	Pathogen: Diarrhoe, HWI	Fakultativ anaerob	
<b>Proteus mirabilis</b>	EDCC 5242, PI	Pathogen: HWI, Bakteriämie	Fakultativ anaerob	
<b>Proteus vulgaris</b>	EDCC 5243, PI	Pathogen: HWI	Fakultativ anaerob	
<b>Providencia rettgeri</b>	EDCC 5198, PI	Pathogen: Diarrhoe	Fakultativ anaerob	
<b>Salmonella enteritidis</b>	EDCC 5088, PI	Pathogen: Gastroenteritis, HWI, Bakteriämie, Osteomyelitis	Fakultativ anaerob	
<b>Salmonella typhimurium</b>	EDCC 5306, PI	Pathogen: Gastroenteritis, HWI, Bakteriämie, Osteomyelitis	Fakultativ anaerob	
<b>Serratia liquefaciens</b>	EDCC 5149, PI	Pathogen: Gastroenteritis, HWI, Bakteriämie	Fakultativ anaerob	
<b>Serratia marcescens</b>	EDCC 5210, PI	Pathogen: Gastroenteritis, HWI, Bakteriämie	Fakultativ anaerob	
<b>Shigella sonnei</b>	EDCC 5211, PI	Pathogen: Gastroenteritis	Fakultativ anaerob	
<b>Staphylococcus lugdunensis</b>	EDCC 5394, PI	Pathogen: HWI, Bakteriämie, Arthritis, Endokarditis	Fakultativ anaerob	
<b>Yersinia enterocolitica</b>	EDCC 5356, PI	Pathogen: Gastroenteritis	Fakultativ anaerob	

### 2.3 Medien und Anzuchtverfahren

*Escherichia coli*, EHEC 1017, EHEC 1018 und EHEC 1022 wurden in flüssigem Lysogeny Broth (LB)-Medium [5 % Hefeextrakt; 10 % Natriumchlorid (NaCl); 10 % Trypton] und *Listeria monocytogenes* in flüssigem Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium [37 % Brain-Heart-Infusion] angezüchtet. Für die weiteren, in der Tab. 2.2-1 aufgeführten, fakultativen Anaerobier erfolgte die Anzucht in flüssigem Tryptic Soy Broth (TSB)-Medium [30 % Casein-Soja-Pepton-Agar (CASO)-Bouillon]. Alle Ansätze wurden bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert.

### 2.4 Vorbereitung der anthocyanreichen Beerenextrakte

Die anthocyanreichen Beerenextrakte (Dakapo, Heidelbeere-Dakapo, Heidelbeere, Accent) sowie der Rubini-Holunderbeer-Liquid wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, um den beschleunigten Zerfall der Anthocyane, welcher bei Raumtemperatur eintritt, zu verlangsamen. Da dieser auch weiter voranschreitet, wenn die Extrakte im jeweiligen Nährmedium (TSB, LB, BHI) gelöst sind, fand das Ansetzen der Suspension erst kurz vor Beginn des Versuches statt. Hierzu wurden 3,4 mg des gewünschten pulverförmigen Extraktes auf der Analysenwaage Kern 770-12 (KERN & Sohn GmbH, Balingen-Frommern) abgewogen, in einem Milliliter des jeweiligen Nährmediums gelöst und mittels Vortex-Genie 2 von Scientific Industries (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gut vermischt. Da das Holunderbeer-Extrakt ein Liquid war, unterschied sich die Vorbereitung von der des pulverförmigen Extraktes. 20 µl des 3,2 %-igen Holunderbeer-Liquids wurden im Verhältnis 1:50 im jeweiligen Nährmedium verdünnt und ebenfalls mittels Vortex-Genie 2 gut vermischt. Um auszuschließen, dass fremde Keime, die sich ggf. im Extrakt befanden, mit in den Versuchsansatz gelangten, wurden die Suspensionen anschließend steril filtriert. Hierfür wurde ein Millex HV Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Millipore, Schwalbach) verwendet (Abb. 2.4-1).

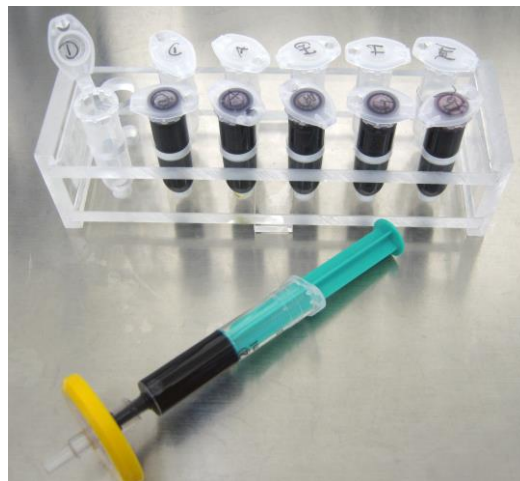


Abb. 2.4-1: Sterile Filtration der anthocyanreichen Beerenextrakte

Die entstandenen Anthocyan-Stocklösungen, welche für die beiden kommenden Versuchsreihen (erneute 1:10 Verdünnung) verwendet wurden, hatten folgende molare Konzentrationen: Dakapo – 660  $\mu\text{M}$  (0,000660 mmol/ml [bezogen auf Malvidin-3-Glucosid]), Accent – 200  $\mu\text{M}$  (0,000224 mmol/ml [bezogen auf Malvidin-3-Glucosid]), Heidelbeere-Dakapo – 267  $\mu\text{M}$  (0,000267 mmol/ml [bezogen auf Malvidin-3-Glucosid]), Heidelbeere – 224  $\mu\text{M}$  (0,000224 mmol/ml [bezogen auf Cyanidin-3-Glucosid]) und Holunderbeere – 1082,4  $\mu\text{M}$  (0,0010824 mmol/ml [bezogen auf Cyanidin-3-Sambubiosid]). Zur Berechnung der Stammlösung wurde jeweils das quantitativ am häufigsten vorkommende Anthocyan gewählt (siehe Anhang „Extrakt-Zusammensetzungen“).

## 2.5 Wachstum der fakultativen Anaerobier in Abhängigkeit von Anthocyanen

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte das Wachstumsverhalten einiger auserwählter fakultativ anaerober Bakterien der humanen Darm-Mikrobiota in Abhängigkeit von verschiedenen anthocyanreichen Beerenextrakten untersucht werden. Hierzu wurden 29 residente und pathogene Subspezies ausgewählt (siehe Tab. 2.2-1). Die Bakterien wurden zunächst in einer Übernachtskultur angezüchtet, danach mit den jeweiligen Extrakten versetzt und anschließend die OD der Ansätze bei 600 nm bestimmt.

### 2.5.1 Pipettierschemata

Die jeweiligen Ansätze von 200  $\mu\text{l}$  wurden in eine 96-Microwell-Platte (Tecan Group Ltd., Crailsheim) pipettiert.

#### 2.5.1.1 Wachstumsveränderung der Subspezies durch Zugabe von verschiedenen anthocyanreichen Beerenextrakten

Um ein anthocyanreiches Beerenextrakt mit einem ausgewählten Bakterium zu testen, wurden in die ersten zwei Wells jeweils 200  $\mu\text{l}$  des Nährmediums pipettiert. Diese stellten den Leerwert dar, gegen den die Bakterien plus Nährmedium gemessen werden sollten. Die drei weiteren Wells enthielten 190  $\mu\text{l}$  Nährmedium und 10  $\mu\text{l}$  aus der angezüchteten Übernachtskultur des zu testenden Bakteriums (Kontrollgruppe). Da sich bei vorherigen Testungen mit dem Infinite® 200 NanoQuant (Tecan Group Ltd., Crailsheim) herausstellte, dass 10  $\mu\text{l}$  der Übernachtskultur eine repräsentative und gut messbare Menge an Bakterien in dem jeweiligen Ansatz bildete, wurde diese für die folgenden Testungen festgelegt. Um dieses Bakterienwachstum mit dem im gleichzeitig angesetzten Bakterien-Anthocyan-Ansatz zu vergleichen, wurde wiederum in zwei Wells 180  $\mu\text{l}$  Nährmedium und 20  $\mu\text{l}$  der angesetzten Anthocyan-Suspension

zusammenpipettiert. Dieser Ansatz stellte den Leerwert für den eigentlichen Versuch mit Nährmedium, den anthocyanreichen Beerenextrakten und den Bakterien dar. Hierzu wurde in drei weitere Wells 170 µl Nährmedium, 20 µl Anthocyan-Suspension und 10 µl aus der angezüchteten Übernachtskultur des zu testenden Bakteriums pipettiert (Versuchsgruppe). Der zweifache Ansatz des Nullwertes sowie der dreifache Ansatz des eigentlichen Versuches wurde gewählt, um später, durch Bildung eines Mittelwertes, zu einem möglichst aussagekräftigem Ergebnis zu gelangen (siehe Anhang „Tecan-Schema 1“).

#### 2.5.1.2 Wachstumsveränderungen der Subspezies durch Zugabe von verschiedenen Anthocyan-Konzentrationen

Für diesen Versuch wurden verschiedene Konzentrationen des Dakapo-Extrakts an ausschließlich fünf der 29 fakultativ anaeroben Bakterien subspezies getestet. Hierzu zählten *EHEC 1017*, *Enterococcus faecalis* V583, *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens* und *Yersinia enterocolitica*. Da nur beispielhaft gezeigt werden sollte, ob überhaupt ein von der Anthocyan-Konzentration abhängiges Wachstum existiert, wurden diese fünf Stämme aufgrund ihrer deutlichen Induktion bzw. Inhibition nach Inkubation mit dem Extrakt gewählt. *EHEC 1017*, *Enterococcus faecalis* V583 sowie *Listeria monocytogenes* sollen im Ergebnisteil genauer demonstriert werden. Basierend auf den vorherigen Dakapo-Versuchsreihen, welche, bezogen auf Malvidin-3-Glucosid, bereits eine molare Konzentration von 66 µM in jedem Well besaßen, kam es nun zur Testung mit folgenden Werten: 0 µM (Bakterien ohne Anthocyan-Extrakt), 11 µM, 22 µM, 33 µM, 44 µM, 55 µM, 66 µM, 77 µM und 88 µM.

Die pro Versuchsreihe (eine Spezies) benötigten 45 Wells waren erneut folgendermaßen aufgeteilt: 2 Wells für den jeweiligen Leerwert und drei Wells für den eigentlichen Versuch. Die Mengenangaben wurden laut Schema in Tab. 2.5-1 pipettiert (siehe Anhang „Tecan-Schema 2“).

Tab. 2.5-1: Pipettierschema: Mengenangaben der Wachstumsversuche mit unterschiedlichen Dakapo-Konzentrationen

$\mu\text{M}$ -Werte im jeweiligen Well	$\mu\text{l}$ Dakapo-SL pro Well (Blank u. Versuch)	$\mu\text{l}$ Medium pro Well (Blank)	$\mu\text{l}$ Medium pro Well (Versuch)	$\mu\text{l}$ Übernachtkultur pro Well (Versuch)
0	0	200	190	10
11	3,3	196,7	186,7	10
22	6,7	193,3	183,3	10
33	10	190	180	10
44	13,3	186,7	176,7	10
55	16,7	183,3	173,3	10
66	20	180	170	10
77	23,3	176,7	166,7	10
88	26,7	173,3	163,3	10

Nach vollständigem Pipettieren der Ansätze (siehe Abb. 2.5-1) wurden diese im Infinite® 200 NanoQuant gemessen.

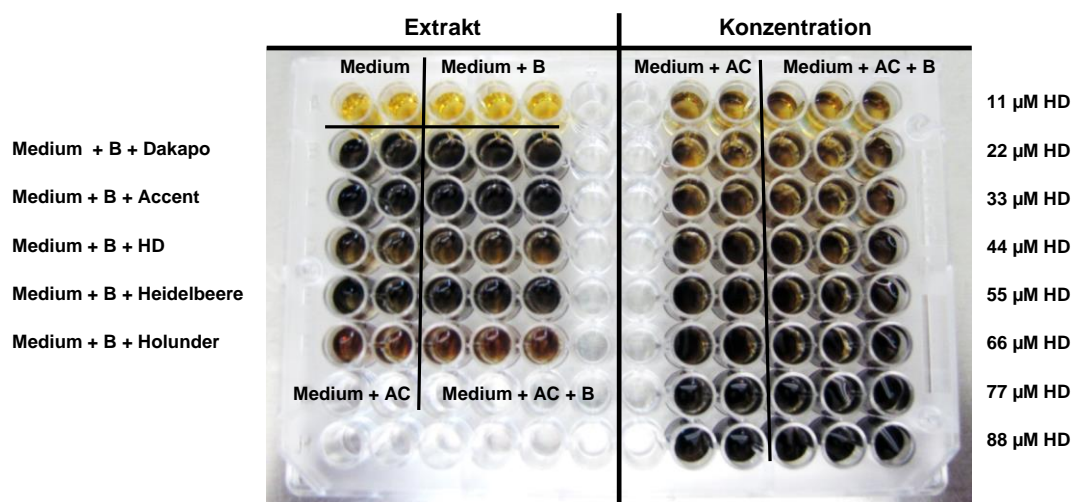


Abb. 2.5-1: Tecan-Ansatz

Beispiel eines Tecan-Ansatzes anhand des Bakteriums (B) *Enterococcus faecalis* V583 mit unterschiedlichen anthocyanreichen Beerenextrakten (AC) links und verschiedenen AC-Konzentrationen des Heidelbeere-Dakapo (HD)-Extraktes (rechts) in TSB-Medium.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass nach Abzug der optischen Dichte der Kontrollgruppe (Medium + AC) von der Versuchsgruppe (Medium + AC + B) ein repräsentatives Bakterienwachstum bei 600 nm messbar war. Somit konnte ein verfälschender Einfluss der Farbe der anthocyanhaltigen Beerenextrakte auf die Messung der optischen Dichte, zur Messung des Bakterienwachstums,

ausgeschlossen werden. Ebenfalls bezogen wir uns hier auf Watzl et al. (32), welche berichteten, dass das Absorptionsmaximum der Anthocyane im Bereich von 465-560 nm liegt und mit dem von uns gewählten 600 nm nicht in Intervention tritt.

## 2.6 Wachstum der fakultativen Anaerobier in Abhängigkeit von Mono- und Polysacchariden

Um im Verlauf der Untersuchungen auszuschließen, dass die im Extrakt vorhandenen Mono- bzw. Polysaccharide für die Induktion bzw. Inhibition des Bakterienwachstums verantwortlich sind, wurde die Versuchsreihe erweitert. In Geisenheim durchgeführte Analysen ergaben nach Rücksprache mit Prof. Dr. Helmut Dietrich keine im Extrakt messbaren (unter Nachweisgrenze) Mengen an freien Mono- bzw. Polysaccharide. Zur Durchführung der Versuche wurden die ausgewählten Bakterien, anstelle von Anthocyanen, mit den im Saft/pro ml (Dakapo-, Accent-, Heidelbeere-Dakapo-Saft) vorhandenen Glucose- und Fructose-Konzentrationen versetzt (siehe Anhang „Monosaccharidangaben der jeweiligen Säfte“) und das Wachstumsverhalten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, mittels Bestimmung der OD<sub>600</sub> untersucht.

### 2.6.1 Vorbereitung der Monosaccharid-Lösung

Die jeweiligen Angaben im A-Saft der drei Extrakte in einem Milliliter für D(+)-Glucose bzw. D(-)-Fructose wurden auf der Analysenwaage Kern 770-12 abgewogen und in einem Milliliter des jeweiligen Nährmediums gelöst. Um eine gute Lösung der Monosaccharide im Nährmedium zu erlangen, wurde die Suspension mittels Vortex-Genie 2 gemischt und anschließend wie unter 2.4 beschrieben steril filtriert, um eine Kontamination mit fremden Keimen auszuschließen.

### 2.6.2 Pipettierschema: Wachstumsveränderung der Bakterien durch Zugabe von verschiedenen Monosacchariden

Auch diese Ansätze wurden wiederum in eine 96-Microwell-Platte pipettiert. Um die Monosaccharid-Konzentrationen mit einem ausgewählten Bakterium zu testen, benötigte man in diesem Fall 8 Wells, welche wie folgt aufgeteilt waren: Zwei Wells mit jeweils 200 µl des Nährmediums als Leerwert, gegen den die zwei Ansätze (Bakterien + Nährmedium, Bakterien + Nährmedium + MS) gemessen wurden. Die Kontrollgruppe in drei Wells enthielt 190 µl Nährmedium und 10 µl aus der angezüchteten Übernachtskultur der zu testenden Subspezies. In drei weiteren Wells wurden 170 µl Nährmedium, 20 µl der Monosaccharid-Suspension und 10 µl aus der angezüchteten Übernachtskultur pipettiert. Diese Ansätze wurde ebenso im Infinite® 200 NanoQuant gemessen und ausgewertet.



## 2.7 Bestimmung der optischen Dichte OD<sub>600nm</sub>

Für die 24-Stunden-Messungen der OD<sub>600nm</sub> wurde das Absorbance-System des Tecan Infinite® 200 NanoQuant verwendet. Es bestand aus folgenden Komponenten: der Lichtquelle, der Absorptionsoptik und der Detektionseinheit.

Vor dem Eintritt in den Monochromaten wurde das Blitzlicht vom Kondensor auf den Eingangsschlitz fokussiert. Die Wellenlänge, welche gemessen werden sollte, konnte innerhalb des Monochromaten eingestellt werden. Hierfür wurden optische Filter eines Bandpasstypes verwendet, welche relativ schmal (2-10 nm) waren und ein steiles Gefälle aufwiesen. Nach Passage des Monochromaten fand die Kopplung des Lichtes an ein Faserbündel statt, welches das Licht in die obere Öffnung des Messgerätes führte. Das Licht selbst wurde durch die obere Linse auf die Probe fokussiert. Der Spiegelschlitten innerhalb der Absorptionsoptik befand sich in Absorptionsposition.

Über zwei kleine Öffnungen wurde ein schmaler und parallel gerichteter Lichtstrahl erzeugt. Das Licht, welches auf die Flüssigkeit fokussiert war, wurde zwischen Luft, Flüssigkeit und Plattenboden leicht gebrochen. Um verlässliche Messgrößen zu erhalten, fing eine fokussierende Linse solche Lichtstrahlen wieder ein, welche möglicherweise zu weit von der optischen Achse entfernt gebrochen wurden. Die Feldgröße des absorbierenden Lichtstrahls betrug 0,5 mm im Durchmesser. Für die Messung der durchdringenden Lichtstrahlen kam eine Silikon-Photodiode zum Einsatz, welche sensitiv für große Breiten von Wellenlängen war (61).

Die Inkubation der Ansätze erfolgte über 24 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C (Minimaltemperatur: 36 °C; Maximaltemperatur: 38 °C) im Tecan, wobei alle 20 Minuten eine Bestimmung der optische Dichte stattfand. Vor jeder Messung wurden die Proben zirkulär bei einer Frequenz von 44,3 rpm und einer Amplitude von 3 mm geschüttelt, um eine homogene Verteilung der Bakterien im Well zu garantieren. Gemessen wurde insgesamt fünf Mal im sogenannten „FilledSquare“ Typ, in einer Größenordnung von 2 x 2 (entspricht vier Messpunkten im Well) und bei einer Wellenlänge von 600 nm sowie einer Bandbreite von 9 nm.

## 2.8 Entwicklung eines SOP zur Stuhlprobenverarbeitung

Im zweiten Teilabschnitt soll auf die Verarbeitung der Stuhlproben eingegangen werden, welche sich aus DNA-Extraktion mittels Maxwell® 16 (Promega GMBH, Mannheim), DNA-Vervielfältigung per 24-well Piko® Thermal Cycler (Fisher Scientific, Schwerte) und anschließender Gel-Elektrophorese sowie DNA-Auftrennung (DHPLC) mittels Wave® System (Transgenomic, Inc., Berlin) zusammensetzt.

Nach Übergabe der Stuhlproben (A- und B-Proben) vom Institut für



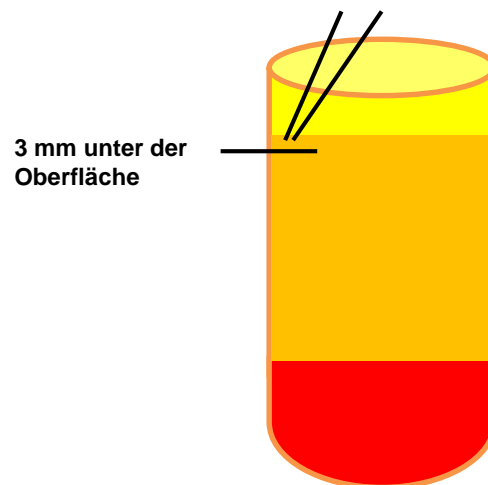
Ernährungswissenschaften Gießen, wurden diese bei -80 °C gelagert und für die weitere Verarbeitung wieder aufgetaut.

Alle folgenden Mengenangaben, welche abgenommen bzw. pipettiert wurden, beruhen auf einem eigens erstellten Standard sowie auf experimentellen Erfahrungen der Arbeitsgruppe.

## 2.8.1 Extraktion der Stuhlproben

### 2.8.1.1 Aufbereitung der Stuhlproben

Für die Experimente wurden 0,2 g einer Stuhlprobe mittels Analysenwaage Kern 770-12 abgewogen, in zwei Millilitern 0,85 %-igem NaCl (0,1 g Stuhl/ml) gelöst und mittels Vortex-Genie 2 zu einer homogenen Suspension verarbeitet. Damit sich die groben Bestandteile absetzen und ein Überstand entstehen konnte, wurde diese für 10 Minuten ruhen gelassen. Anschließend erfolgte die Entnahme von 30 µl Überstand drei Millimeter unter der Suspensionsoberfläche (siehe Abb. 2.8-1).



**Abb. 2.8-1: Entnahme der 30 µl aus dem Überstand 3 mm unter der Oberfläche**

Daraufhin erfolgte das Pipettieren dieser Menge in 500 µl 0,85 %-ige NaCl-Lösung und das Mischen mittels Vortex-Genie 2.

Für die weitere Verarbeitung der Suspensionen wurde je Probe jeweils eine Maxwell® 16 LEV RNA Cartridge vom Typ AS640A327226 im schwarzen Maxwell® 16 LEV Cartridge-Rack vom Typ AS1251 (Promega GMBH, Mannheim) vorbereitet (Gesamtkapazität: 16 Proben pro Lauf). Jeder Kartusche war wiederum ein 0,5 ml-Elution-Tube (Promega GmbH, Mannheim) mit 100 µl nukleasefreiem Wasser (Promega GmbH, Mannheim) zugeordnet. Dieses befand sich im Rack vor der jeweiligen Kartusche. In die erste Kammer der Kartusche wurden abschließend 100 µl der zuvor noch einmal gemischten endgültigen Suspension (500 µl 0,85 %-iger NaCl-

Lösung + 30 µl Ausgangssuspension) pipettiert und in die siebte Kammer ein sogenannter LEV-Plunger gesteckt (62).

### 2.8.1.2 DNA-Extraktion

Der Maxwell® 16 besaß in seiner Grundausstattung bereits vorprogrammierte Protokolle, aus welchen auf Empfehlung des Herstellers (Promega GmbH) das Nukleinsäure-Aufreinigungsprotokoll (RNA-Protokoll) mit einer Laufdauer von 35 Minuten gewählt wurde. Die Extraktion der DNA/RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers (Promega GmbH, Mannheim). Nach der Beendigung des Laufes wurde zu der aufgereinigten DNA/RNA in den „Elutionstubes“ jeweils 400 µl nukleasefreies Wasser hinzupipettiert und beides schonend miteinander vermischt.

### 2.8.2 DNA-Vervielfältigung mittels Piko® Thermal Cycler

Im nächsten Schritt erfolgte die Verarbeitung der mittels Maxwell-Extraktion gewonnenen DNA/RNA-Proben mit dem 24-Well Piko® Thermal Cyclers. Vervielfältigt wurde der 16S rDNA-Abschnitt aller in der Probe vorhandenen Bakterienspezies, welcher einer Länge von 474 Basenpaaren entspricht. Die unten genannten Primer banden hierzu an die konservierten Regionen der 16S rDNA und ermöglichten somit eine Vervielfältigung der dazwischen liegenden Abschnitte.

5' -3' Sequenz	Primer	Referenz
GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G	0933F	(53)
GAC GGG CGG TGT GTA CAA G	1407R	(53)

#### 2.8.2.1 Vorbereitung der DNA-Proben

Für einen PCR-Ansatz wurden benötigt: der „2xPhusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix F-548S/L“ (inkl. der Hot Start II DNA-Polymerase), die 933F- (Forward) und 1407R- (Reverse) Primer (10 pmol/µl bzw. 100 pmol/µl) sowie die durch die Maxwell-Extraktion gewonnene bakterielle DNA aus den Stuhlproben (Template) und autoklaviertes H<sub>2</sub>O.

Primer, Phusionmix und Templates wurden nach dem Auftauen während des gesamten Arbeitsvorgangs auf Eis gekühlt. Je nach Anzahl der Ansätze fand die Gabe der PCR-Bestandteile entweder direkt in das autoklavierte Piko® Thermal Cycler Cap (Fisher Scientific, Schwerte) statt (1-4 Ansätze), oder es erfolgte die Anfertigung eines Mastermixes (ab 5 Ansätzen) für bis zu 24 Templates. Pipettiert wurde laut Volumenschema in Tab. 2.8-1.

Vor dem Pipettieren der Templates wurden diese für ca. eine Minute in einer Magnetvorrichtung (Promega GmbH, Mannheim) ruhen gelassen und bis zum

Abpipettieren der 5 µl dort belassen. Hierdurch sollten die durch den Maxwell-Lauf eventuell übrig gebliebenen magnetischen Beads (MagneSil PMPs) in der Suspension zurückgehalten werden, so dass sie beim Entnehmen nicht mit in den Piko® Thermal Cycler-Ansatz gelangen und später möglicherweise die DHPLC-Analyse beeinträchtigen. Es wurde stets eine Positiv-(*Escherichia coli*-DNA) bzw. Negativkontrolle (autoklaviertes Wasser) mitgeführt.

**Tab. 2.8-1: Pipettierschema der Ansätze für den 24-well Piko® Thermal Cycler zur DNA-Vervielfältigung der extrahierten Stuhlproben**

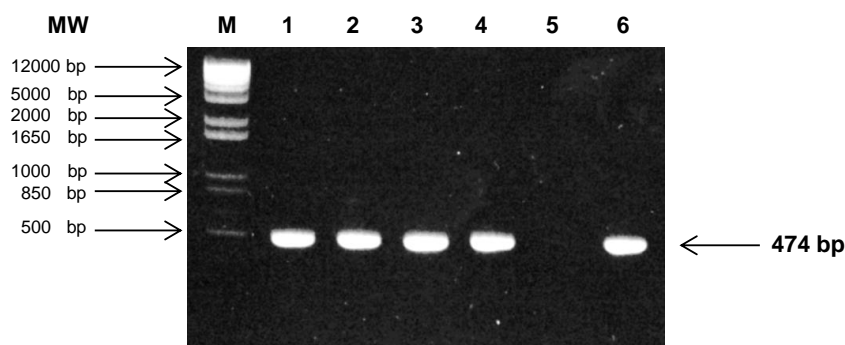
	PCR-Mix, Konzentrationen (Bemerkungen)	Für 1 bis 4 Ansätze (Beispiel für 1 Ansatz)	PCR-Mix, Konzentrationen, Bemerkungen	Ab 5 Ansätzen (Beispiel für 5 Ansätze)
<b>Mix</b>	2x Phusion	25 µl	2x Phusion	125 µl
<b>Primer</b>	1407 (10 pmol/µl)	2,5 µl	1407 (100 pmol/µl)	1,25 µl (5x0,25)
<b>Primer</b>	933 (10 pmol/ µl)	2,5 µl	933 (100 pmol/ µl)	1,25 µl (5x0,25)
<b>Wasser</b>		15 µl		97,5 µl
<b>Template</b>	A/B Stühle DNA	5 µl	A/B Stühle DNA	5 µl später
				45 µl/ cap
<b>Gesamtvolumen</b>	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

#### 2.8.2.2 DNA-Vervielfältigung mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese

Das ausgewählte PCR-Protokoll hatte eine Laufzeit von ca. 30 Minuten und beinhaltete folgende Schritte: Zuerst fand eine Denaturierung bei 98 °C für 10 Sekunden statt, gefolgt von der Hybridisierung für fünf Sekunden bei 68 °C und der Elongation für 10 Sekunden bei 72 °C (35 Zyklen). Am Ende des Laufes wurde noch einmal ein einminütiger Abschnitt bei 72° C eingeschoben, in welchem gegebenenfalls noch nicht elongierte DNA-Abschnitte prozessiert werden konnten. Vor jedem neuen Zyklus erfolgte die Anhebung der Temperatur auf 98 °C. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die PCR-Produkte auf 4 °C herunter gekühlt.

Für die anschließende Analyse mittels Agarosegel-Elektrophorese wurden 10 µl des jeweiligen PCR-Produktes gemischt mit 10 µl Auftragspuffer Ficoll (Pharmacia) auf ein horizontales 1 %-iges TBE-Gel (Merck) mit Ethidiumbromid [0,5 %](Eppendorf AG, Hamburg)-Agarose-Gel pipettiert und dieses bei 150 V für eine Stunde bei Raumtemperatur in 1x TBE-Puffer laufen gelassen. Nach Beendigung des Laufes

wurde das Gel unter UV-Licht mittels Quantity One – 4.6.3 Gel Doc XR (Bio Rad, München) ausgewertet (siehe Abb. 2.8-2).



**Abb. 2.8-2: Mittels UV-Licht ausgewertetes Agarose-Gel**

Probandin 10, Stuhlprobe A (Versuchstag 1) mit jeweils zwei Ansätzen à 20 µl Volumen, dem Marker (M) mit Angabe des Molekulargewichtes (MW) in Basenpaare (bp) sowie der Negativ- (5) und Positivkontrolle (6). Für die Ansätze 1 und 2 wurden jeweils 5 µl (1. und 2. Geltasche), für die Ansätze 3 und 4 jeweils 30 µl (3. und 4. Geltasche) der Stuhlprobensuspension verarbeitet.

### 2.8.3 Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

Nachdem, basierend auf der aufgereinigten und isolierten DNA der Stuhlproben, die 16S rDNA-Abschnitte der Bakterien mittels 24-Well Piko® Thermal Cyclers vervielfacht wurden, sollten diese PCR-Produkte im nächsten Schritt durch die DHPLC im WAVE® System aufgetrennt werden. Hierzu wurden jeweils 30 µl der Produkte bzw. 30 µl autoklaviertes Wasser (Negativkontrolle) in eine 96-Well-Platte (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe) pipettiert.

Das WAVE®-System setzte sich aus einer stationären Phase (Chromatographiesäule) und einer mobilen Phase (Puffer) zusammen. Die DNASep® HT cartridge (Transgenomic, Inc., Berlin), welche die stationäre Phase repräsentierte, war aus Polystyrene-Divinylbenzen-Copolymeren aufgebaut, elektrisch neutral und hydrophob. Die flüssige Phase bestand wiederum aus Puffer A [0,1 M Triethylammoniumacetat (TEAA)] und Puffer B [0,1 M TEAA + 25% Acetonitril]. Der Puffer C [0,1 M TEAA + 75% Acetonitril] wurde lediglich zum Reinigen der Säule verwendet.

Die Probe wurde automatisch aus der 96-Well-Platte auf dem WAVE®-Rack entnommen und in die mobile Phase des WAVE® Systems injiziert. Mittels einer Hochdruckpumpe erfolgte der Fluss der Puffer A und B sowie der Probe durch das WAVE®-System über die DNASep® HT cartridge, welche mittels einer Heizvorrichtung auf eine Temperatur von 62 °C aufgeheizt wurde. Im Anschluss erfolgte die Messung durch einen nachgestellten UV-Detektor (Transgenomic, Inc., Berlin). Wie bereits oben erwähnt, war die DNASep® HT cartridge elektrisch neutral geladen und hydrophob. Diese Eigenschaften machten es der DNA, welche eine negative Ladung aufweist, unmöglich sich an die Säule zu binden. Um diese Bindung dennoch zu ermöglichen,

wurde das im Puffer vorhandene TEAA verwendet. Das Ammonium-Ion des TEAA wies eine positive Ladung auf, womit es in der Lage war, sich an die negativ geladenen Phosphate der 16S rDNA-Abschnitte zu binden.

Parallel hierzu banden die Alkylketten des TEAA an die hydrophobe Oberfläche der DNASep® HT cartridge (63). Die stufenweise Abtrennung der 16S rDNA-Abschnitte von der Säule konnte auf Grund der unterschiedlichen Quantität der Basenpaare erfolgen. Ebenso spielten eine Erhöhung des Acetonitrilgehaltes, wobei das Verhältnis zwischen den Puffern A und B von großer Bedeutung war, und die Temperatur eine wesentliche Rolle (53). Abschließend wurden die 16S rDNA-Fragmente von einem UV-Detektor bei 260 nm detektiert, wobei die Umwandlung des analogen Signals in einen digitalen Wert stattfand (63). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Chromatogrammen mit einer Reihe von Peaks, welche die verschiedenen DNA-Fragmente repräsentierten.

## 2.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

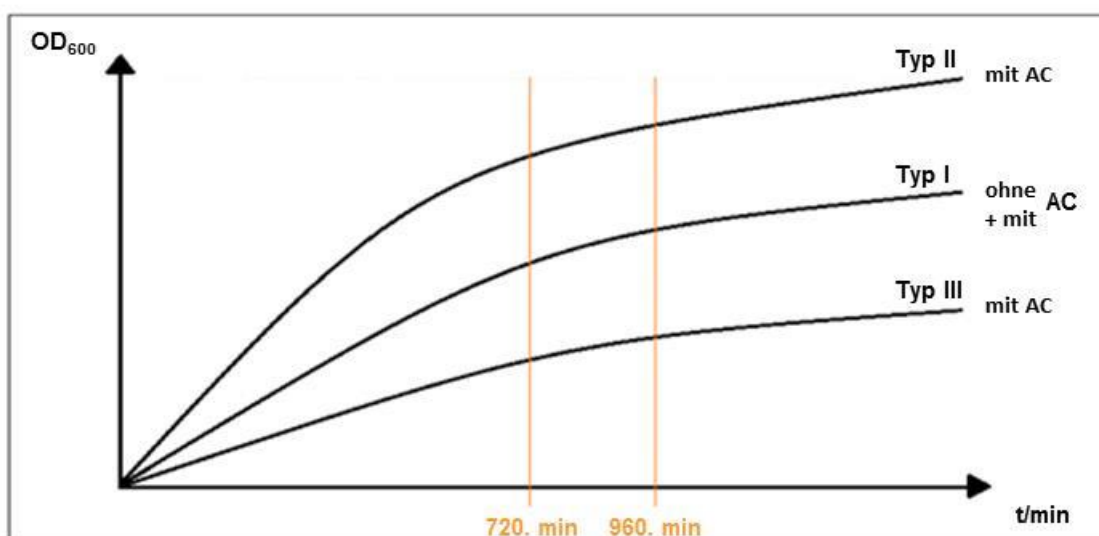
Nach Abschluss der Messungen wurde zunächst die  $OD_{600nm}$  mittels der Magellan™ – Data Analysis Software (Tecan Group Ltd.) des Tecan Infinite® 200 NanoQuant ermittelt. Hierfür erfolgte die Berechnung des arithmetischen Mittels jeder 20 minütigen Messung der Blank- sowie der Versuch-Wells. Im Anschluss wurde der gemittelte Leerwert des Blanks von den Messwerten des Versuchsansatzes subtrahiert. Anhand des Programms SigmaPlot 10.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) und des Programms MS-Excel 2003 (Microsoft GmbH Deutschland, Unterschleißheim) wurden die im Ergebnisteil vorliegenden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und ausgewertet. Die Auswertung der Stuhlproben-Analysen, sowie die Konstruktion der Profile, erfolgte mittels Navigator™ Software Version 3.0 (Transgenomic, Inc., Berlin) des WAVE® Systems.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Wachstumsbeeinflussung einzelner Bakterienspezies durch anthocyanreiche Beerenextrakte

Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils soll präsentiert werden, wie die unterschiedlichen fakultativ anaeroben Vertreter der humanen Darm-Mikrobiota auf die verschiedenen anthocyanreichen Beerenextrakte reagierten. Gleichzeitig erfolgt ein Vergleich der Wachstumskurven, welche nach Inkubation der Bakterien mit der jeweiligen Monosaccharid-Konzentration aus dem A-Saft (siehe Anhang „Monosaccharid-Angaben der jeweiligen Säfte“) von Dakapo, Accent und Heidelbeere-Dakapo erstellt wurden.

Nachdem die vom Infinite® 200 NanoQuant gemessenen Daten gemittelt und mithilfe von MS-Excel 2003 in Kurven dargestellt wurden, fand die Bewertung des Wachstums, im Vergleich zur Kontrollgruppe, im Messzeitraum zwischen der 720.- 960. Minute (12.-16. Stunde) für die fakultativen Anaerobier statt (siehe Abb. 3.1-1). Dieser Bereich wurde gewählt, da sich hier die deutlichsten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe im Wachstum zeigten. Die Einteilung erfolgte anhand der nachstehenden Kriterien und bezog sich auf die  $OD_{600}$  (siehe Tab. 3.1-1). Der Abstand bezeichnet grundsätzlich die Abweichung der Versuchs- (ohne anthocyanreiche Beerenextrakte) von der Kontrollgruppe (mit anthocyanreichen Beerenextrakten).



**Abb. 3.1-1: Charakterisierung und Bewertung des Bakterienwachstums nach Zugabe von verschiedenen anthocyanreichen Beerenextrakten**

Zur besseren Beurteilung des Wachstumsverhaltens erfolgte die Einteilung in drei verschiedene Typen. Typ I stellte zum einen die Kontrollgruppe (ohne Zugabe von anthocyanreichen Beerenextrakten) dar bzw. zeigte keinen Einfluss im Wachstum. Typ II zeigte eine Induktion, Typ III eine Inhibition nach Zugabe von anthocyanhaltigen Beerenextrakten. Die Bewertung des Wachstums erfolgte zwischen der 720.- 960. Minute.

Tab. 3.1-1: Bewertungskriterien des Kurvenwachstums anhand der OD<sub>600</sub>

Bezeichnung	Bemerkungen	Differenz der Kurven in OD <sub>600</sub>
+++	entspricht einem Abstand der Kurven von	> + 0,50
++	entspricht einem Abstand der Kurven von	> + 0,25 bis + 0,49
+	entspricht einem Abstand der Kurven von	> + 0,10 bis + 0,24
+/-	entspricht einem Abstand der Kurven von	+/- 0,09 bis 0,01
0	entspricht „Deckungsgleichheit“ der Kurven	0
-	entspricht einem Abstand der Kurven von	< - 0,10 bis - 0,24
--	entspricht einem Abstand der Kurven von	< - 0,25 bis - 0,49
---	entspricht einem Abstand der Kurven von	< - 0,50

Wie die Einteilung bereits vermuten lässt, ließen sich sehr unterschiedliche Ergebnisse verzeichnen. Die detaillierte Bewertung des Wachstums der einzelnen Subspezies sind der Tab. 3.1-2 zu entnehmen.

Im Anschluss daran sollten die Ergebnisse des Teilversuches „Wachstumsveränderungen der Subspezies durch Zugabe von verschiedenen Anthocyan-Konzentrationen“ aufgezeigt und besprochen werden.

Für die Einteilung der Achsen in den Grafiken wurden nachstehende Einheiten verwendet: Die x-Achse trägt die Größe „Zeit in Minuten“, während die y-Achse die „OD<sub>600</sub> (nm)“ aufzeigt. Während die Aufteilung der x-Achse von 0 bis 1400 Minuten konstant bleibt, variiert die Einteilung der y-Achse stark von 0 bis 0,5 nm bzw. bis 4,0 nm. Die individuelle Darstellung basiert auf dem unterschiedlich starken Wachstum der Bakterien.

### 3.1.1 Charakterisierung des Wachstums der fakultativen Anaerobier anhand einiger ausgewählter Subspezies

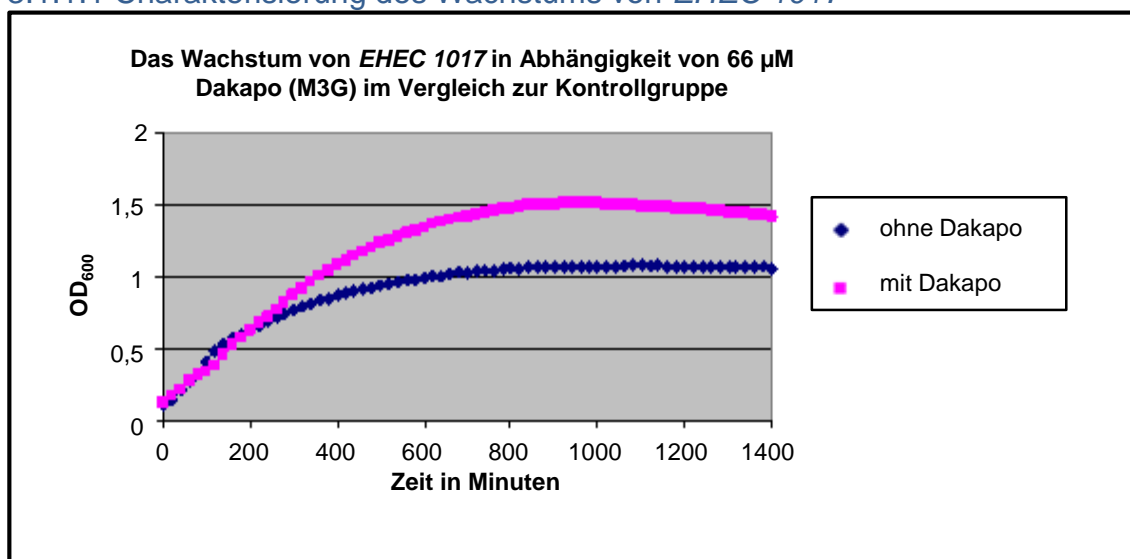
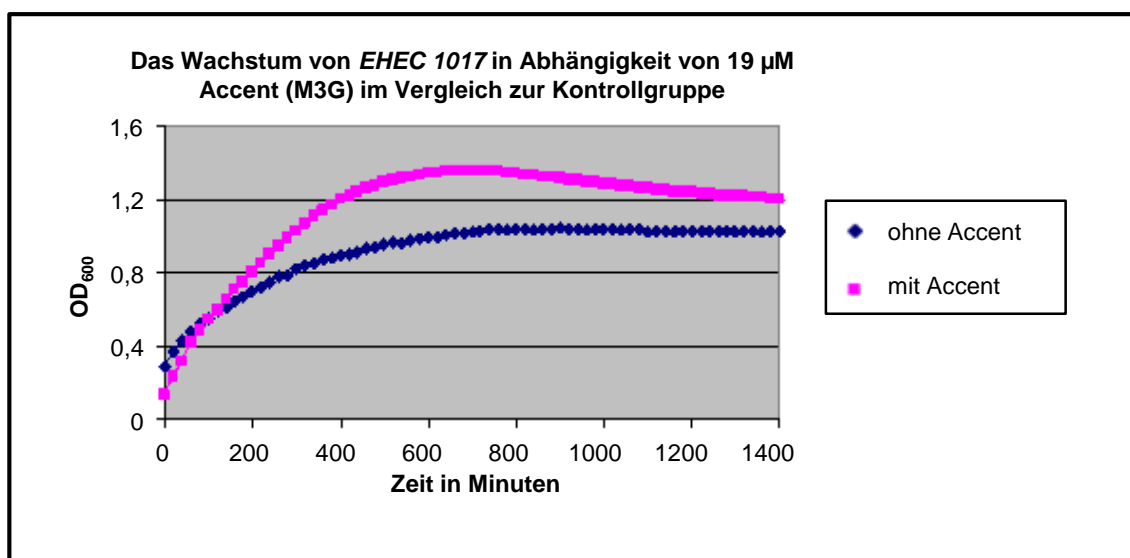
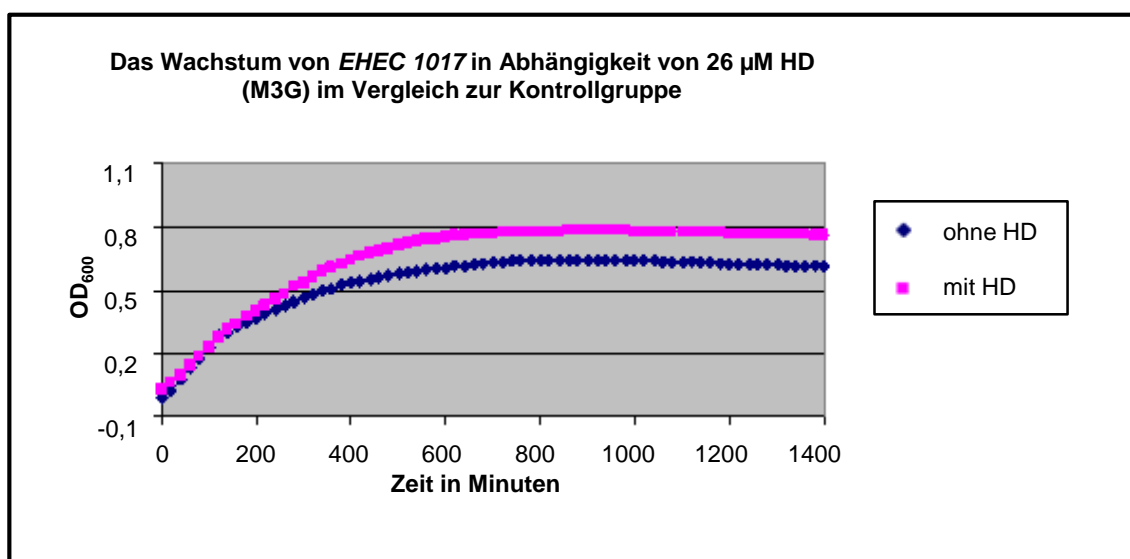
Mithilfe von folgenden drei Subspezies: *EHEC 1017*, *Enterococcus faecalis* V583 und *Listeria monocytogenes* soll auf den Wachstumsverlauf nach Inkubation mit den anthocyanreichen Beerenextrakten im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas detaillierter eingegangen werden.

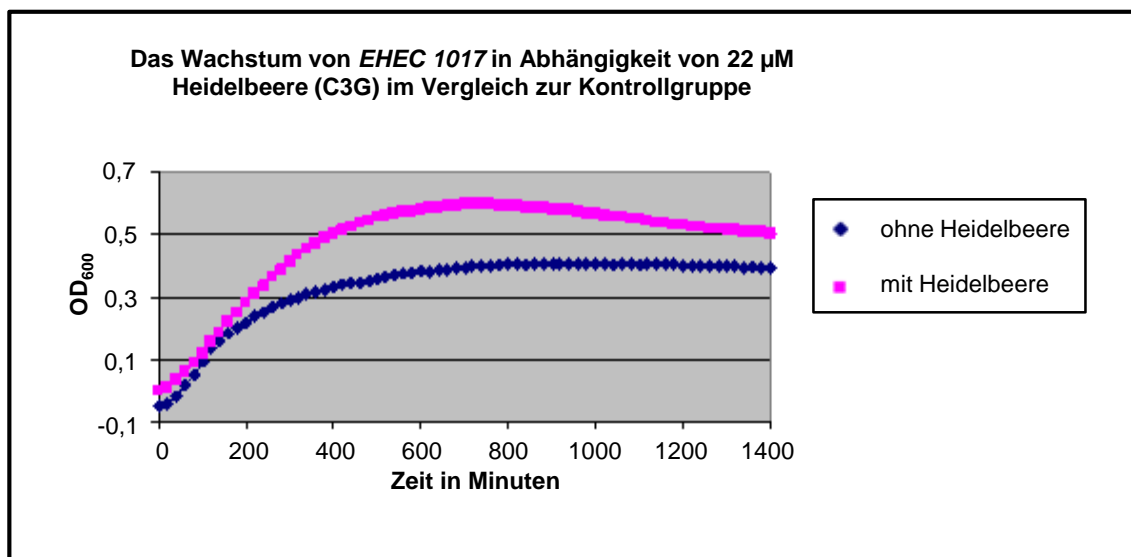
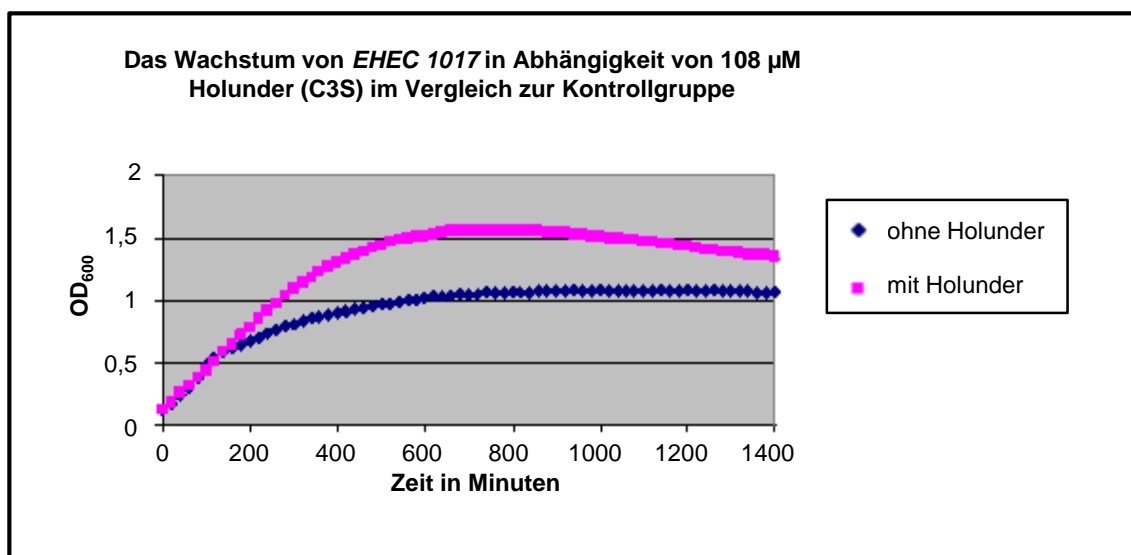
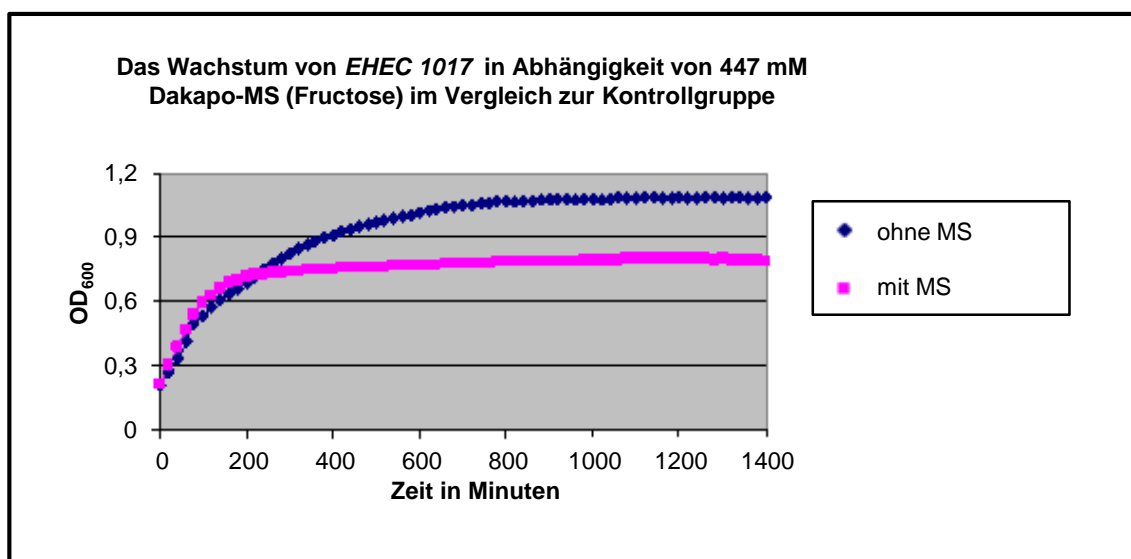
**Tab. 3.1-2: Bewertung des Wachstums der fakultativen Anaerobier nach Inkubation mit den verschiedenen anthocyanreichen Beerenextrakten zwischen der 12.-16. Stunde**

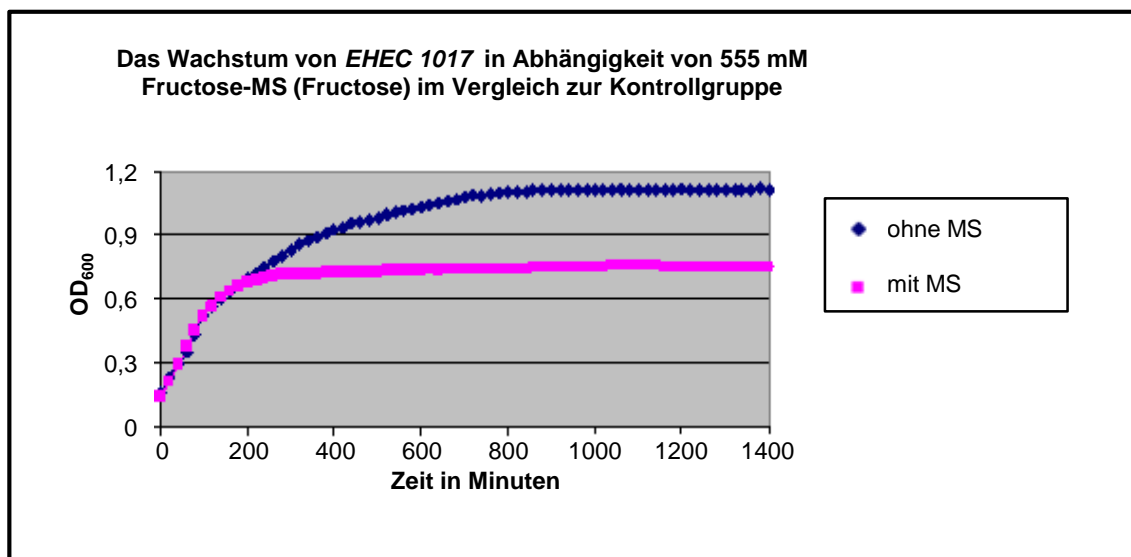
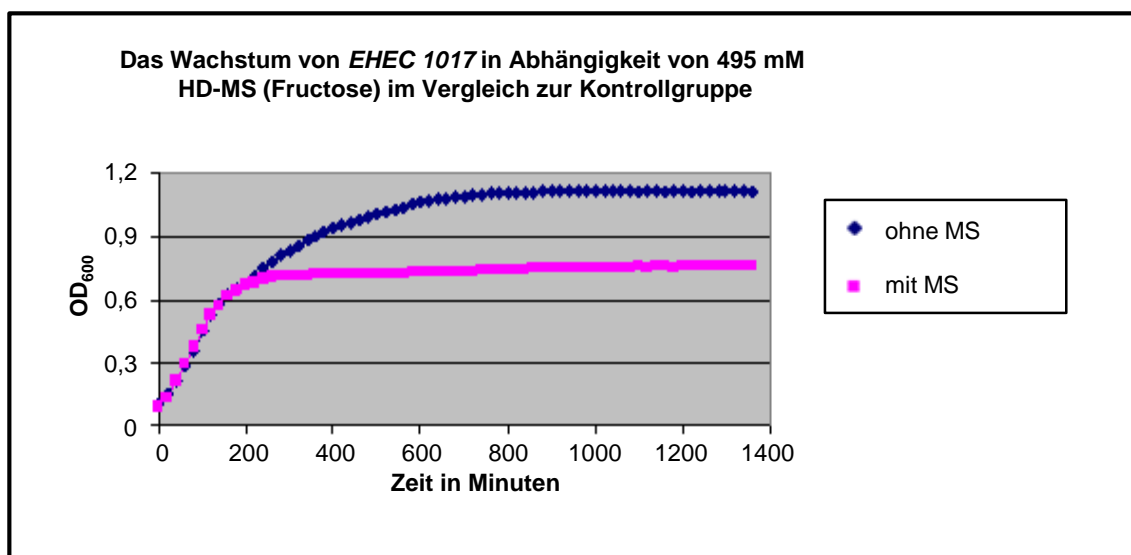
Vertreter der 3 unterschiedlichen Typen (siehe Tab 3.1-1) werden hier beispielhaft anhand der Akkolade verdeutlicht.

Bakterienspezies	Dakapo	Accent	Heidelbeere -Dakapo	Heidelbeere	Holunder	
<i>E.coli</i>	++	++	+	++	++	} Typ II
<i>EHEC (O157:H7)</i>	++	++	+	++	++	
<i>EHEC (O111:H8)</i>	+++	++	+	++	++	
<i>EHEC (O26:H11)</i>	++	+++	++	++	++	
<i>Enterococcus faecalis</i>	---	--	--	--	-	} Typ III
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	---	--	--	--	--	
<i>Enterococcus faecalis</i> Symbioflor 1	--	-	-	--	--	
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	-	--	
<i>Shigella sonnei</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
<i>Salmonella enteritidis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
<i>Providencia rettgeri</i>	0	0	0	0	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
<i>Citrobacter diversus</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	++	++	0	++	++	
<i>Enterobacter cloacae</i>	++	++	+/-	++	++	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	++	++	+	++	++	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	--	--	-	-	--	
<i>Hafnia alvei</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
<i>Staphylococcus</i> <i>lugdunensis</i>	0	0	0	0	-	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	++	++	+	+	++	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0	+	
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	0	+	
<i>Bacillus cereus</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	-	} Typ I
<i>Serratia liquefaciens</i>	++	++	++	++	++	
<i>Serratia marcescens</i>	+++	++	++	++	++	
<i>Morganella morganii</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	+	0	0	+/-	0	

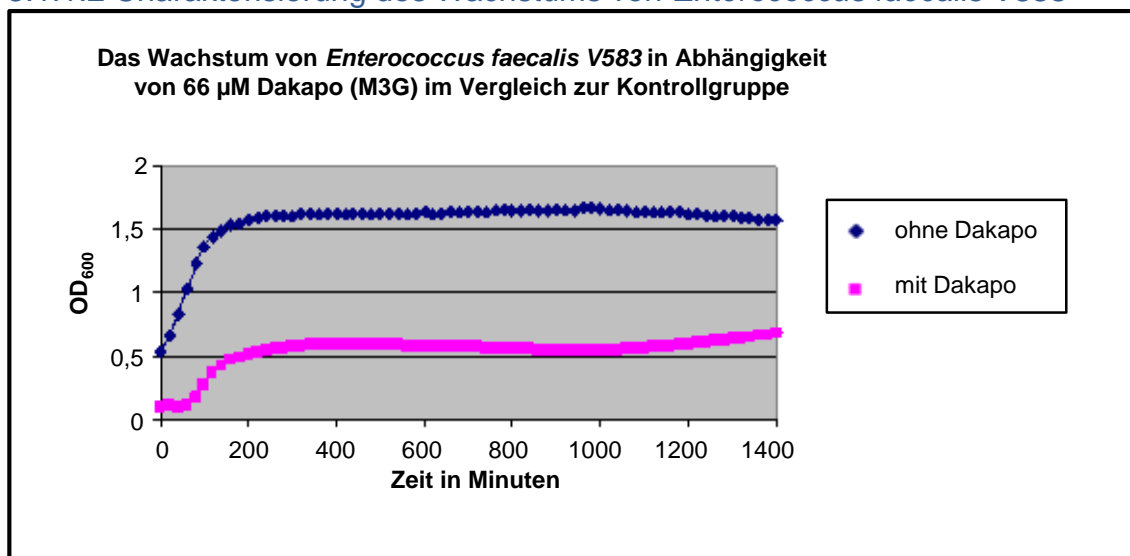
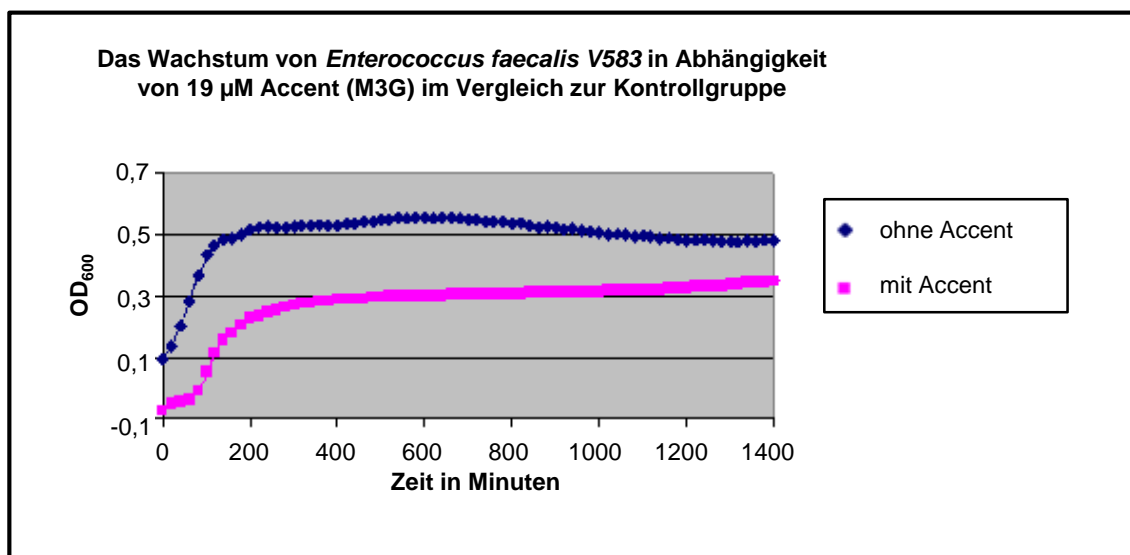
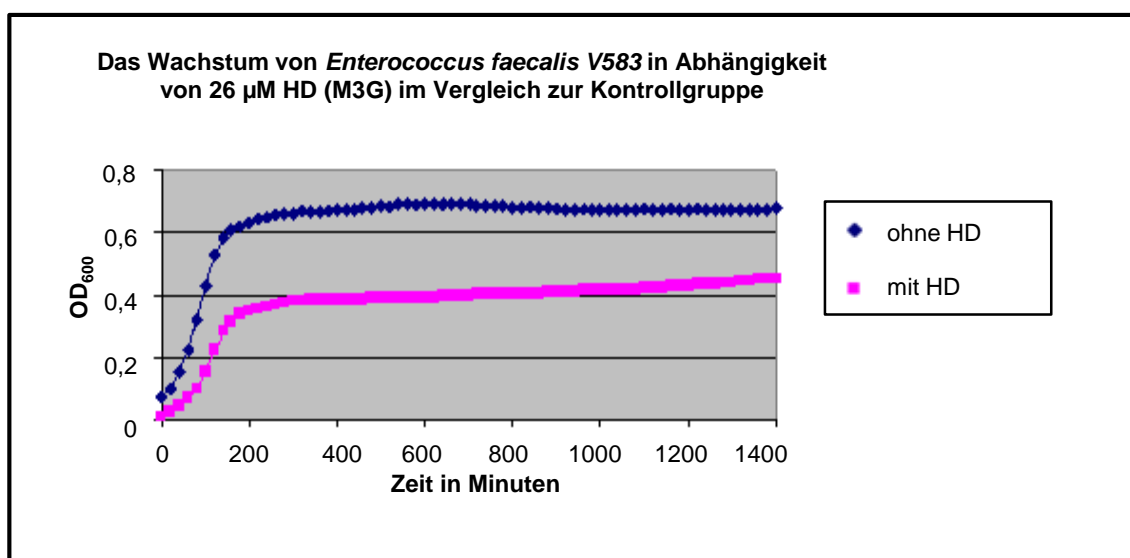


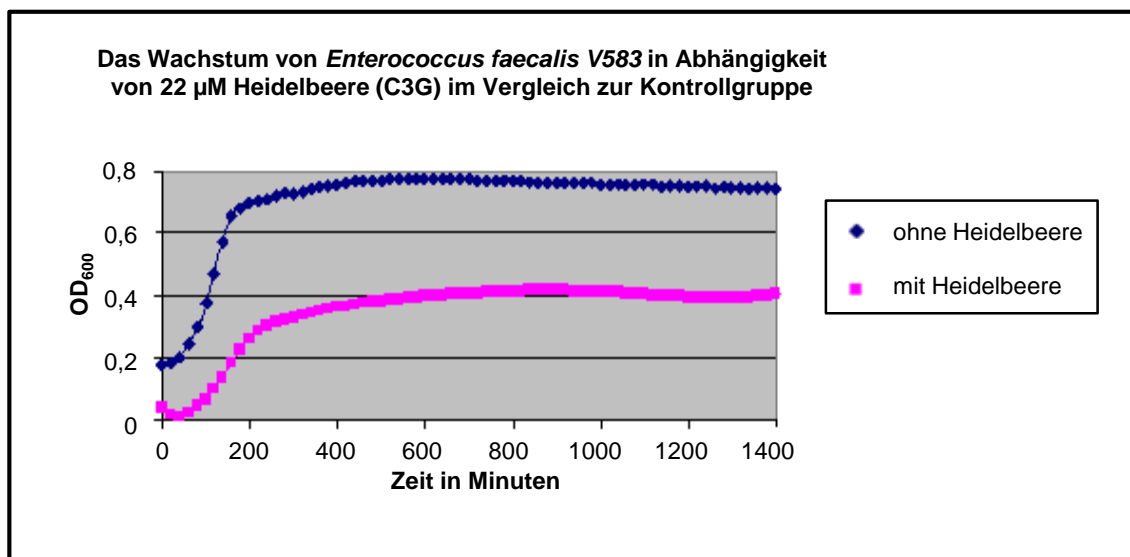
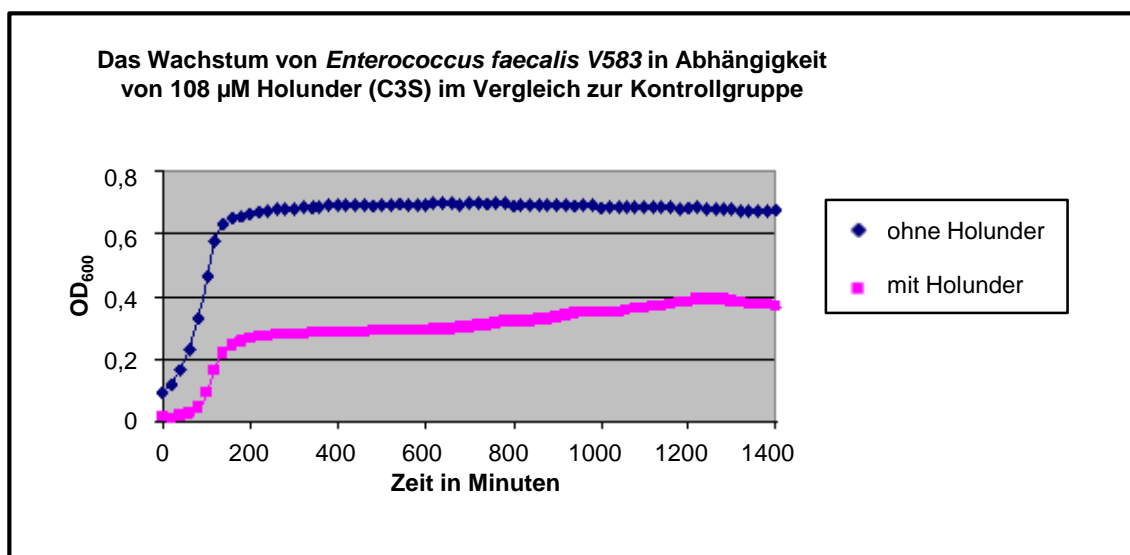
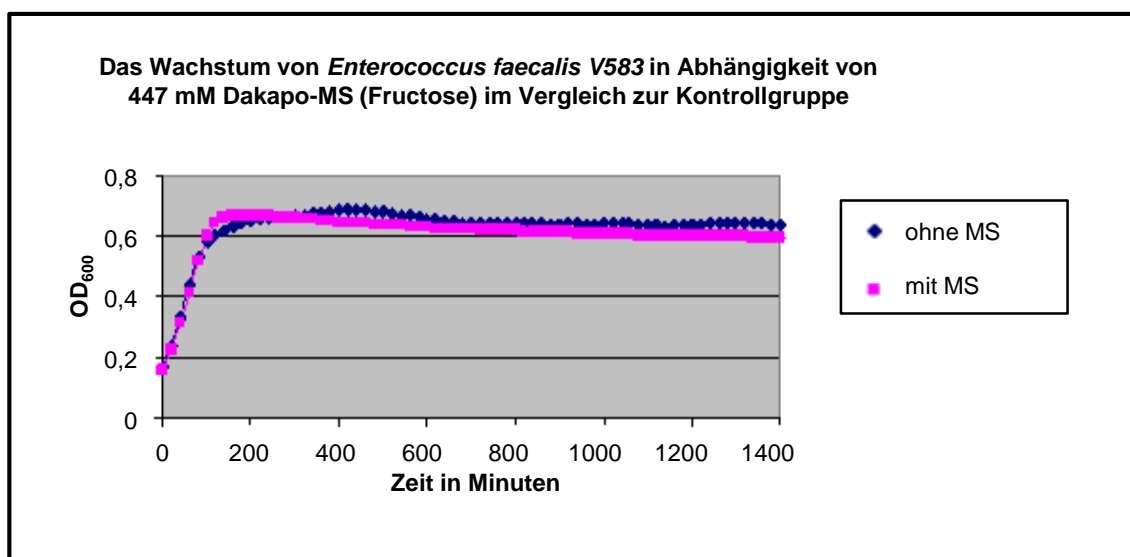
3.1.1.1 Charakterisierung des Wachstums von *EHEC 1017*Abb.: 3.1-2: *EHEC 1017* mit 66  $\mu\text{M}$  DakapoAbb.: 3.1-3: *EHEC 1017* mit 19  $\mu\text{M}$  AccentAbb. 3.1-4: *EHEC 1017* mit 26  $\mu\text{M}$  HD

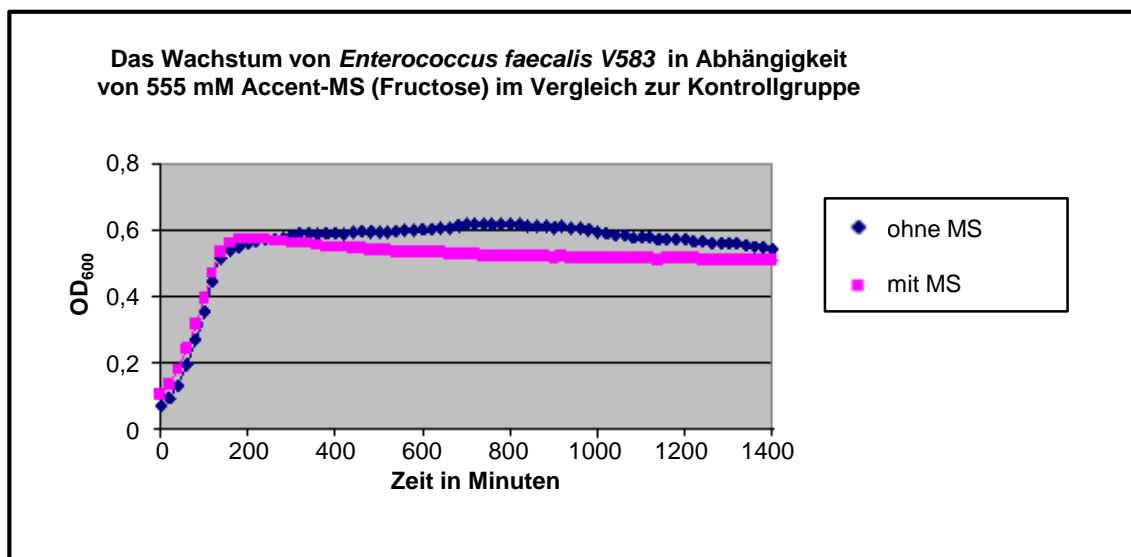
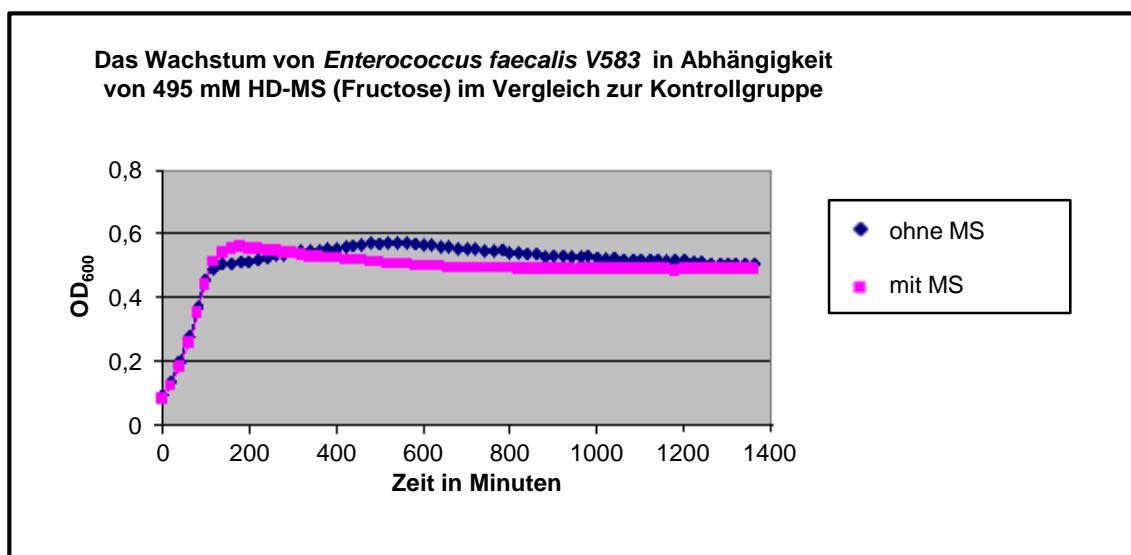
Abb. 3.1-5: *EHEC 1017* mit 22  $\mu\text{M}$  HeidelbeereAbb. 3.1-6: *EHEC 1017* mit 108  $\mu\text{M}$  HolunderAbb. 3.1-7: *EHEC 1017* mit 447 mM Dakapo-MS

Abb. 3.1-8: *EHEC 1017* mit 555 mM Accent-MSAbb. 3.1-9: *EHEC 1017* mit 495 mM HD-MS

In diesem Abschnitt sollen die Wachstumskurven des *EHEC 1017* besprochen werden. Das gramnegative Bakterium zeigt nach der Inkubation mit den anthocyanreichen Beerenextrakten im Vergleich zur Kontrollgruppe durchgehend eine Induktion (Typ II, siehe Abb. 3.1-1) des Wachstums (Abb. 3.1-2 bis 6). Bis zur 200. Minute verhält sich das Wachstum der 2 Kurven noch annähernd identisch, weist aber dann im weiteren Verlauf einen Unterschied der OD<sub>600nm</sub> von bis zu 0,5 nm auf. Gegen Ende des Versuches nähert sich die Versuchsgruppe der Kontrollgruppe wieder an. Im Gegensatz hierzu zeigt sich in den 3 Zusatzversuchen, in welchen *EHEC 1017* mit den Monosaccharid-Konzentrationen der verschiedenen A-Säfte von Dakapo, Accent und Heidelbeere-Dakapo inkubiert ist, eine Inhibition des Wachstums (Abb. 3.1-7 bis 9).

3.1.1.2 Charakterisierung des Wachstums von *Enterococcus faecalis* V583Abb. 3.1-10: *Enterococcus faecalis* V583 mit 66  $\mu\text{M}$  DakapoAbb. 3.1-11: *Enterococcus faecalis* V583 mit 19  $\mu\text{M}$  AccentAbb. 3.1-12: *Enterococcus faecalis* V583 mit 26  $\mu\text{M}$  HD

Abb. 3.1-13: *Enterococcus faecalis* V583 mit 22  $\mu$ M HeidelbeereAbb. 3.1-14: *Enterococcus faecalis* V583 mit 108  $\mu$ M HolunderAbb. 3.1-15: *Enterococcus faecalis* V583 mit 447 mM Dakapo-MS

Abb. 3.1-16: *Enterococcus faecalis* V583 mit 555 mM Accent-MSAbb. 3.1-17: *Enterococcus faecalis* V583 mit 495 mM HD-MS

Im Versuch mit dem grampositiven Bakterium *Enterococcus faecalis* V583 ist während der Inkubation mit den verschiedenen anthocyanreichen Beerenextrakten durchgehend eine Inhibition (Typ III, siehe Abb. 3.1-1) des Wachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen (Abb. 3.1.10 bis 14). Betrachtet man allerdings die Wachstumskurven mit Accent und Heidelbeere-Dakapo, so stellt man fest, dass hier eine etwas geringere Inhibition im Gegensatz zu den anderen 3 anderen Extrakten stattfindet. Auch in diesem Versuch scheint sich die Versuchsgruppe der Kontrollgruppe zum Ende der Messung hin wieder anzunähern. Obwohl die jeweilige Kontrollgruppe die gleiche Bakterienmenge von 10 µl Übernachtskultur wie die in der Versuchsgruppe enthält, unterscheidet sich die OD<sub>600nm</sub> bereits von Beginn der Messungen an.

Im Vergleich hierzu sollen nun die Kurven betrachtet werden, welche *Enterococcus faecalis* V583 nach Inkubation mit und ohne Monosacchariden aus den drei A-Säften von Dakapo, Accent und Heidelbeere-Dakapo zeigt (Abb. 3.1-15 bis 17). Auf allen 3 Abbildungen lässt sich erkennen, dass die Kurven der Kontroll- und der Versuchsgruppe annähernd identisch sind und kaum Ähnlichkeiten mit der Anthocyan-Versuchsgruppe zeigen.

### 3.1.1.3 Charakterisierung des Wachstums von *Listeria monocytogenes*

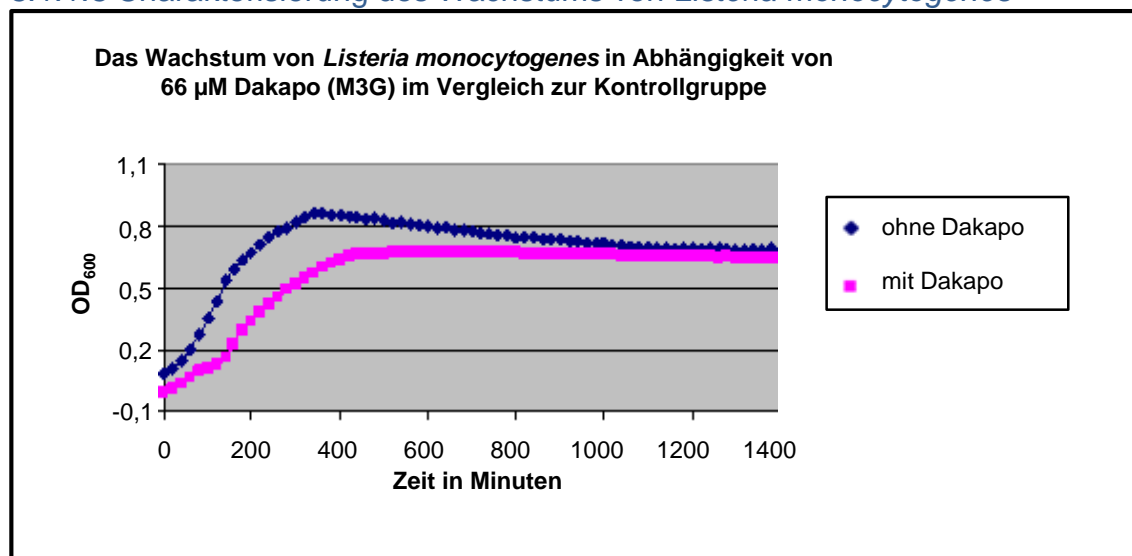


Abb. 3.1-18: *Listeria monocytogenes* mit 66  $\mu\text{M}$  Dakapo

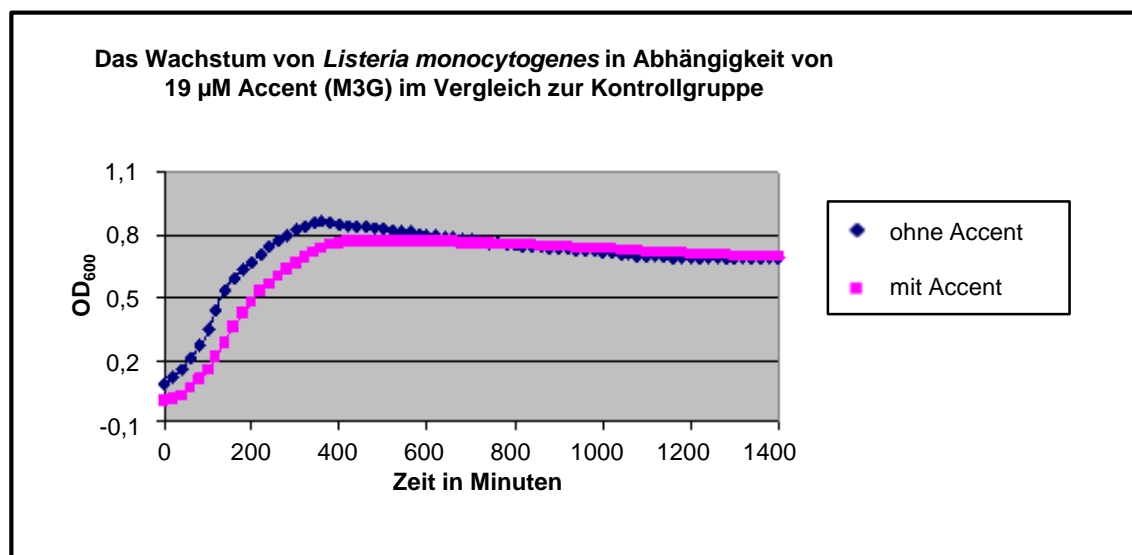


Abb. 3.1-19: *Listeria monocytogenes* mit 19  $\mu\text{M}$  Accent

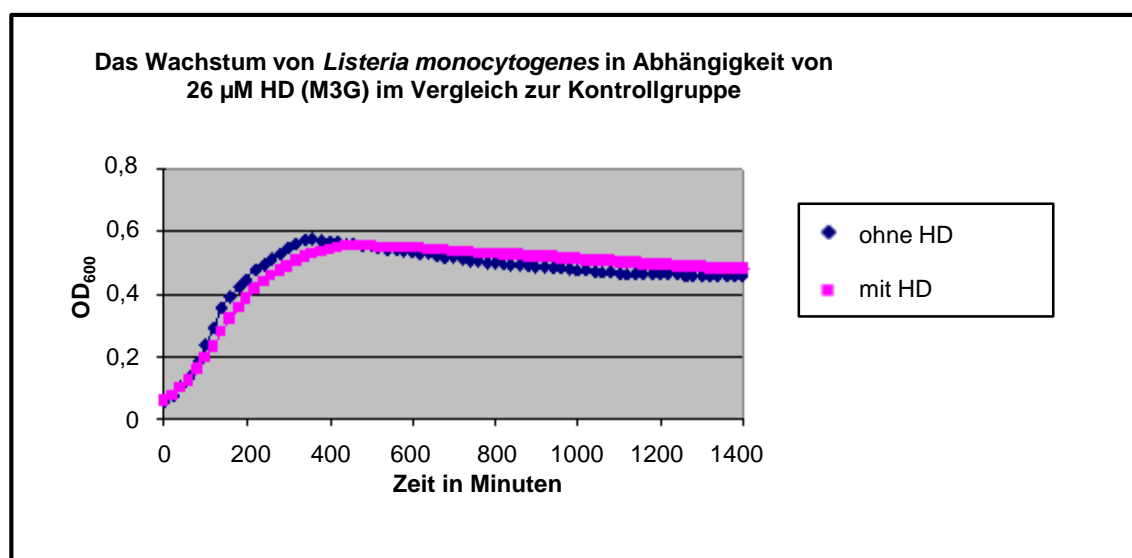
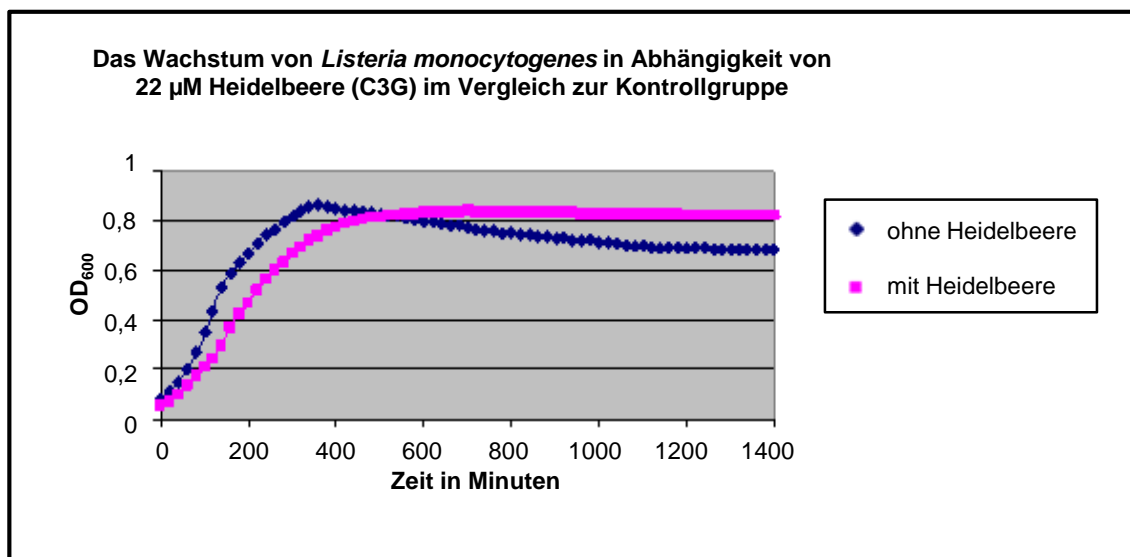
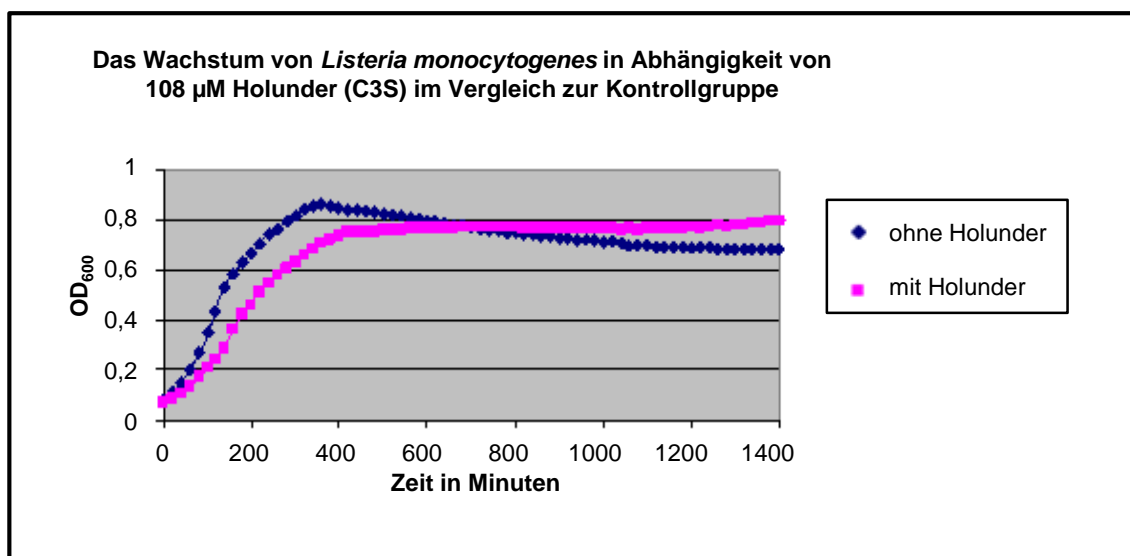
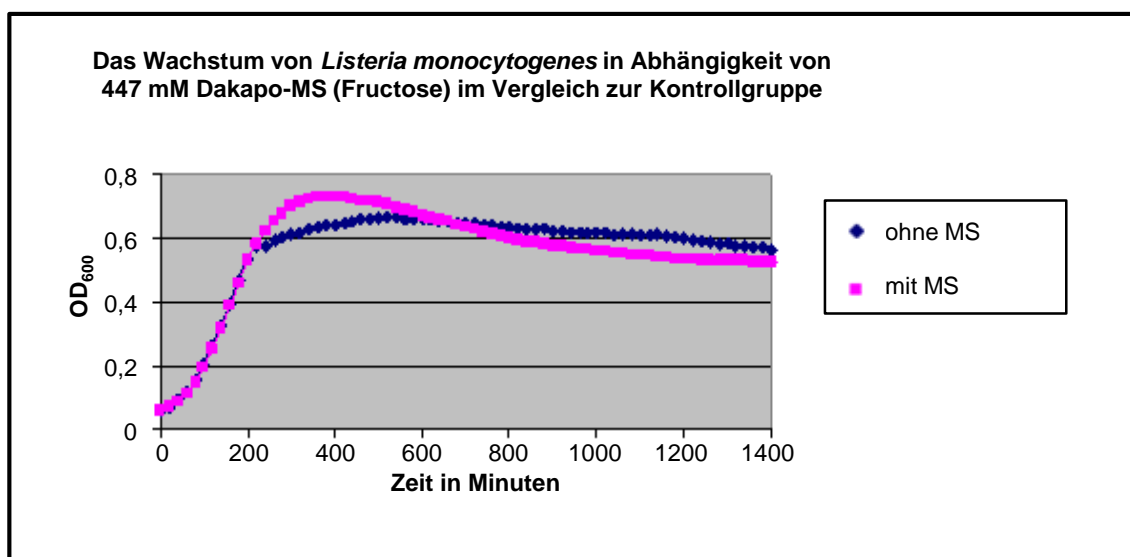
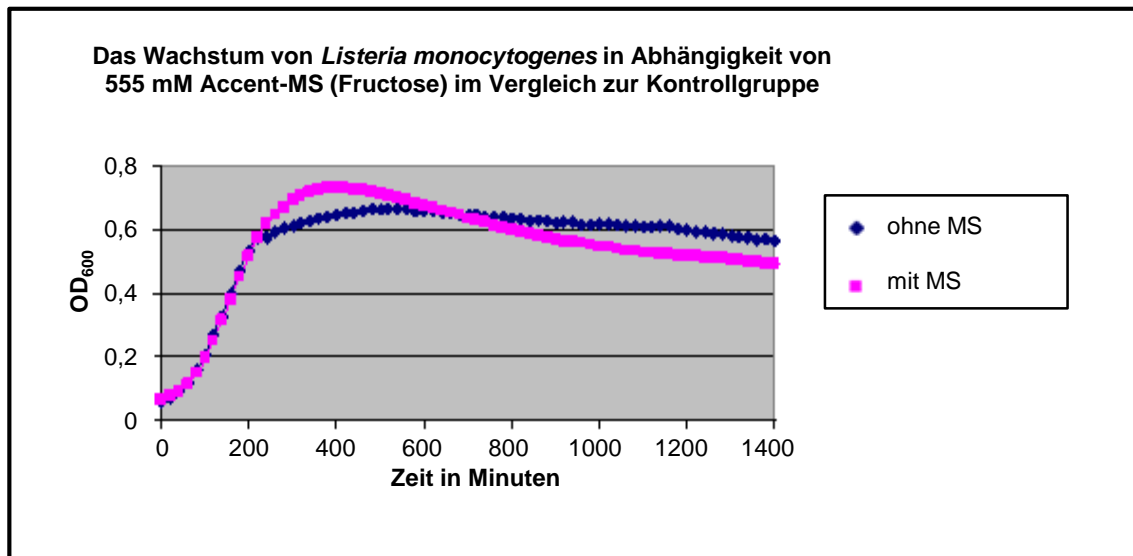
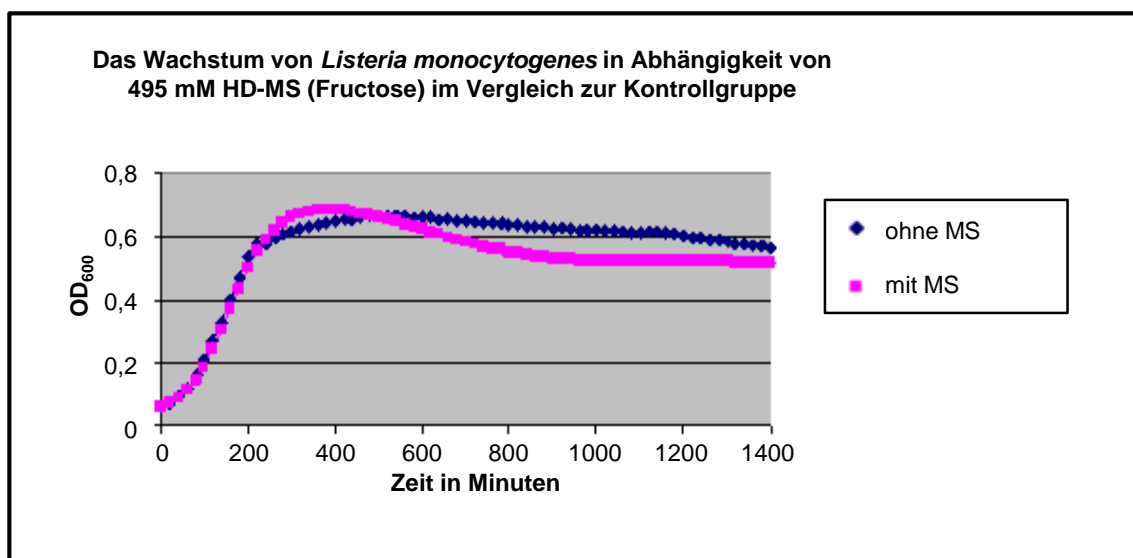


Abb. 3.1-20: *Listeria monocytogenes* mit 26  $\mu\text{M}$  HD



Abb. 3.1-21: *Listeria monocytogenes* mit 22  $\mu$ M HeidelbeereAbb. 3.1-22: *Listeria monocytogenes* mit 108  $\mu$ M HolunderAbb. 3.1-23: *Listeria monocytogenes* mit 447 mM Dakapo-MS

Abb. 3.1-24: *Listeria monocytogenes* mit 555 mM Accent-MSAbb. 3.1-25: *Listeria monocytogenes* mit 495 mM HD-MS

Zuletzt soll auf den Wachstumskurvenverlauf von *Listeria monocytogenes* eingegangen werden. Nachdem die Startpunkte der Kontroll- und der Versuchsgruppe in 3 von 5 Fällen identisch (Typ I, siehe Abb. 3.1-1) sind, wird das Wachstum der Bakterien in der Versuchsgruppe mit allen 5 Extrakten von Beginn an gehemmt (Abb. 3.1.18 bis 22). Eine Änderung tritt frühestens ab der 500. Minute ein. Während das Wachstum der Kontrollgruppe wieder abzunehmen scheint, stagniert das Wachstum der Versuchsgruppe bzw. nimmt langsamer ab. Die Wachstumskurven im Versuch mit Dakapo und Accent passen sich mit der Zeit wieder einander an. Im Falle von Heidelbeere, Heidelbeere-Dakapo und Holunder liegt das Wachstum der Versuchsgruppe von der 500. Minute an bis zum Schluss über dem Wachstumsniveau von *Listeria monocytogenes* ohne anthocyanreiches Beerenextrakt. Auch in diesem

Falle zeigen die Wachstumskurven nach der Inkubation von *Listeria monocytogenes* mit den Monosaccharid-Extrakten aus den A-Säften von Dakapo, Accent und Heidelbeere-Dakapo einen anderen Verlauf auf, als in den Anthocyan-Versuchen (Abb. 3.1.23 bis 25). Während das Wachstum der Versuchsgruppe ab der 250. Minute zuerst über das Niveau der Kontrollgruppe steigt, fällt es zwischen der 500. und 600. Minute bereits wieder darunter ab.

### 3.1.2 Wachstumsbeeinflussung fakultativer Anaerobier mittels verschiedener Anthocyan-Konzentrationen

Im Anschluss an diese Versuchsreihe sollen die Ergebnisse der Messung in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dakapo-Konzentrationen präsentiert werden. Die Darstellung erfolgt anhand der bereits im vorherigen Abschnitt gewählten Subspezies. Die erste Grafik zeigt jeweils den Wachstumskurvenverlauf der Kontrollgruppe sowie den der Versuchsgruppe (Bakterien) inkubiert mit den acht (11µM, 22µM, 33µM, 44µM, 55µM, 66µM, 77µM und 88µM) Dakapo-Konzentrationen (bezogen auf M3G). Diese Abbildungen (Abb. 3.1-26/28/30) bilden die Grundlage für die im weiteren Verlauf gezeigten Tabellen sowie halblogarithmischen Darstellungen (3.1-27/29/31). Der Zeitpunkt wurde für jede Spezies individuell abgestimmt.

#### 3.1.2.1 Charakterisierung des Wachstums von *EHEC 1017*

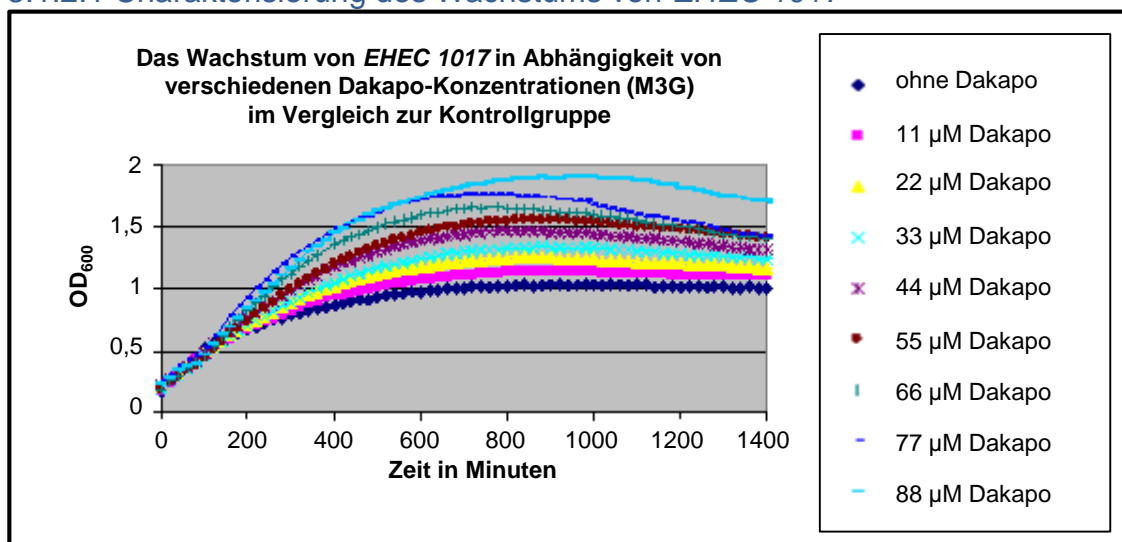
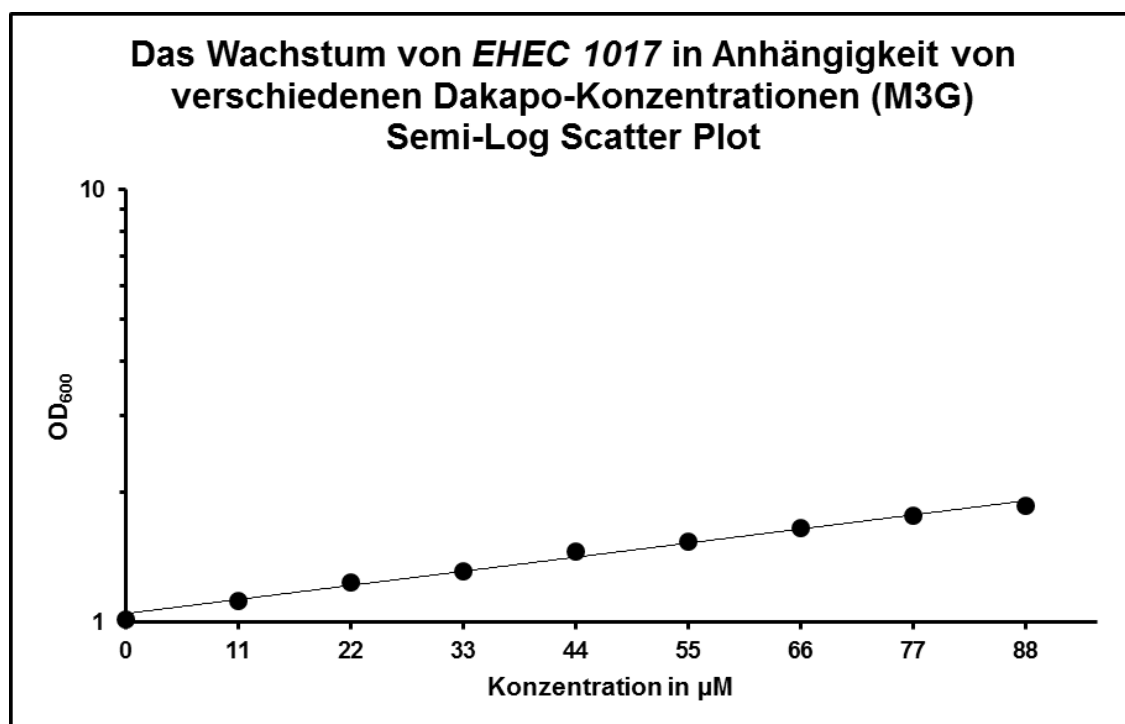


Abb. 3.1-26: *EHEC 1017* mit verschiedenen Dakapo-Konzentrationen

Auf der oberen Abbildung 3.1-26 lässt sich ein gemeinsamer Ausgangspunkt bei 0,2 ( $OD_{600}$  in nm) für alle 9 Wachstumskurven erkennen. Bis zur 200. Minute ist das Wachstum des *EHEC 1017* in der Kontroll- und den verschiedenen Versuchsgruppen noch relativ identisch. Über diesen Zeitpunkt hinaus setzt jedoch eine unterschiedlich starke Induktion ein, welche mit der Höhe der Dakapo-Konzentration steigt (Typ II, siehe Abb. 3.1-1). Für die folgende Darstellung (Abb. 3.1-27) wurde der Zeitpunkt „760. Minute“ ausgewählt. Die jeweiligen Werte der  $OD_{600}$  sind der Tabelle 3.1-3 zu entnehmen.

Tab. 3.1-3: OD<sub>600nm</sub>-Werte für *EHEC 1017* in der 760. Minute

Dakapo-Konzentration in $\mu\text{M}$ (basierend auf M3G)	Werte der OD <sub>600</sub> in nm (zum Zeitpunkt 760. Minute)
0	1,0175
11	1,1221
22	1,2364
33	1,3141
44	1,4561
55	1,5336
66	1,6523
77	1,7639
88	1,8565

Abb. 3.1-27: *EHEC 1017* mit verschiedenen Dakapo-Konzentrationen in halblogarithmischer Darstellung

Anhand dieser halblogarithmischen Darstellung (Abb. 3.1-27) wird noch einmal die vorhandene Abhängigkeit des Wachstums von *EHEC 1017*, basierend auf den unterschiedlichen Dakapo-Konzentrationen, verdeutlicht. Der Verlauf der Geraden ist, bezogen auf die Konzentration in  $\mu\text{M}$ , annähernd linear ansteigend.

### 3.1.2.2 Charakterisierung des Wachstums von *Enterococcus faecalis* V583

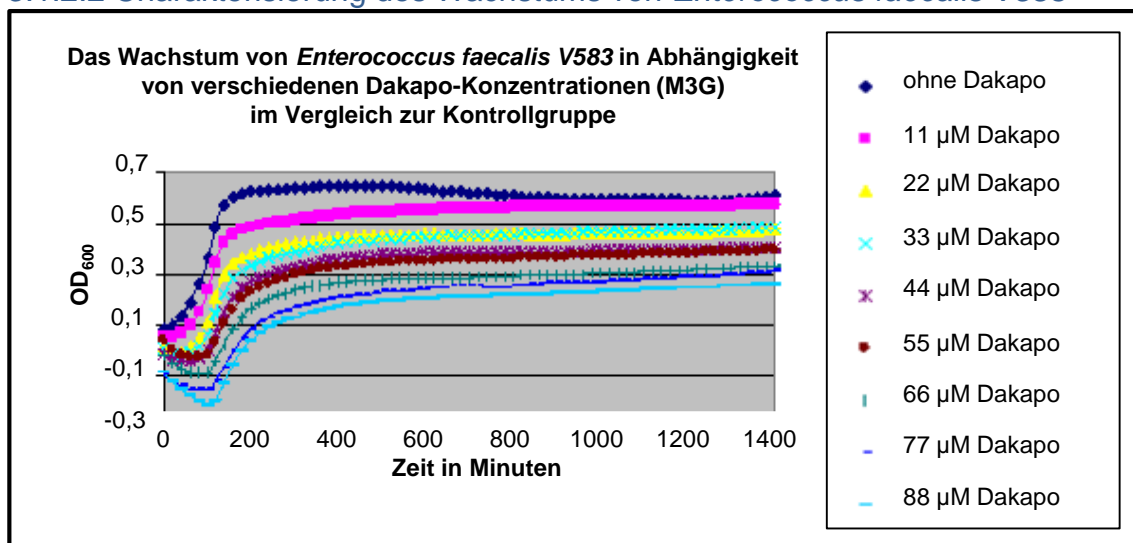


Abb. 3.1-28: *Enterococcus faecalis* V583 mit verschiedenen Dakapo-Konzentrationen

Inkubiert mit den unterschiedlichen Dakapo-Konzentrationen verhält sich das Wachstum des *Enterococcus faecalis* V583 bereits von Beginn der Messungen an asynchron, und es besteht kein gemeinsamer Startpunkt. Wie beim *EHEC 1017* wird auch in dieser Grafik (Abb. 3.1-28) verdeutlicht, dass ein von der Dakapo-Konzentration abhängiges Wachstum existiert. Hier tritt hingegen eine Inhibition (Typ III, siehe Abb. 3.1-1) auf, welche mit zunehmendem Dakapo-Gehalt im Versuchsansatz zunimmt (Abb. 3.1-28). Wie in der oberen Abbildung sichtbar wird, fällt in allen Ansätzen das Wachstum kurz nach Beginn der Messungen ab, um dann wenig später wieder anzusteigen. Es verbleibt jedoch immer unter dem Niveau der Kontrollgruppe. Für die ergänzende Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde der Zeitpunkt „260. Minute“ gewählt (Abb. 3.1-29). Die jeweiligen Werte der OD<sub>600</sub> sind der Tabelle 3.1-4 zu entnehmen.

Tab. 3.1-4: OD<sub>600nm</sub>-Werte für *Enterococcus faecalis* V583 in der 260. Minute

Dakapo-Konzentration in µM (basierend auf M3G)	Werte der OD <sub>600</sub> in nm (zum Zeitpunkt 260. Minute)
0	0,6331
11	0,5046
22	0,4088
33	0,3755
44	0,3136
55	0,2788
66	0,2159
77	0,1487
88	0,107

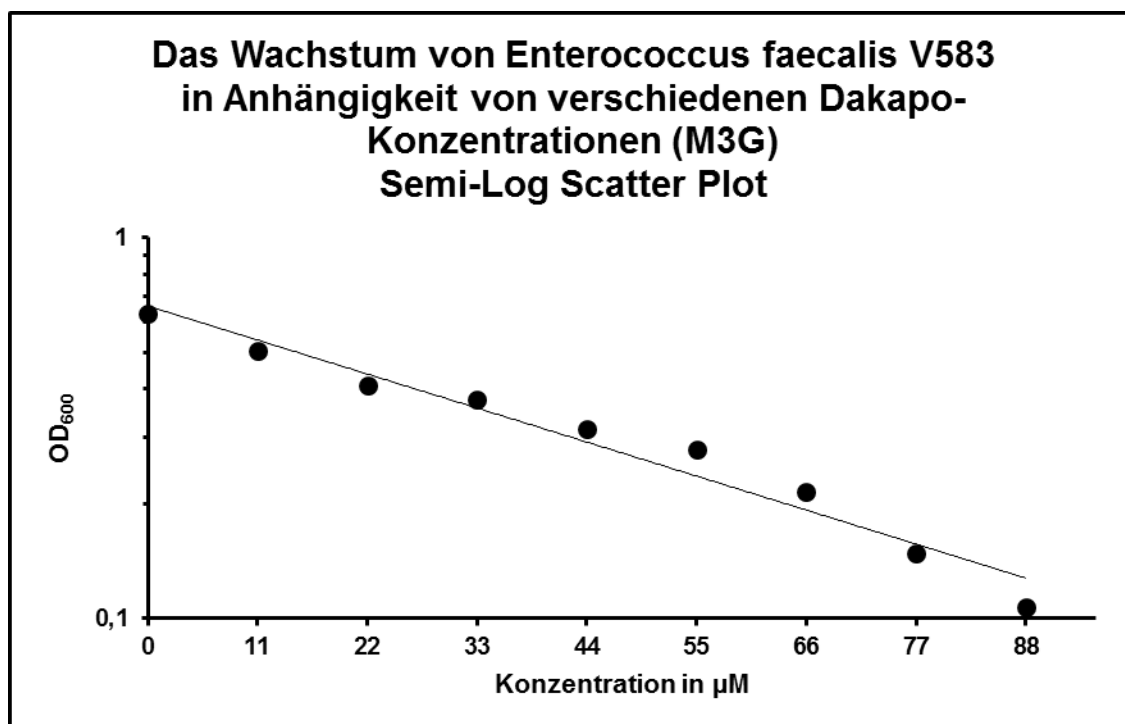
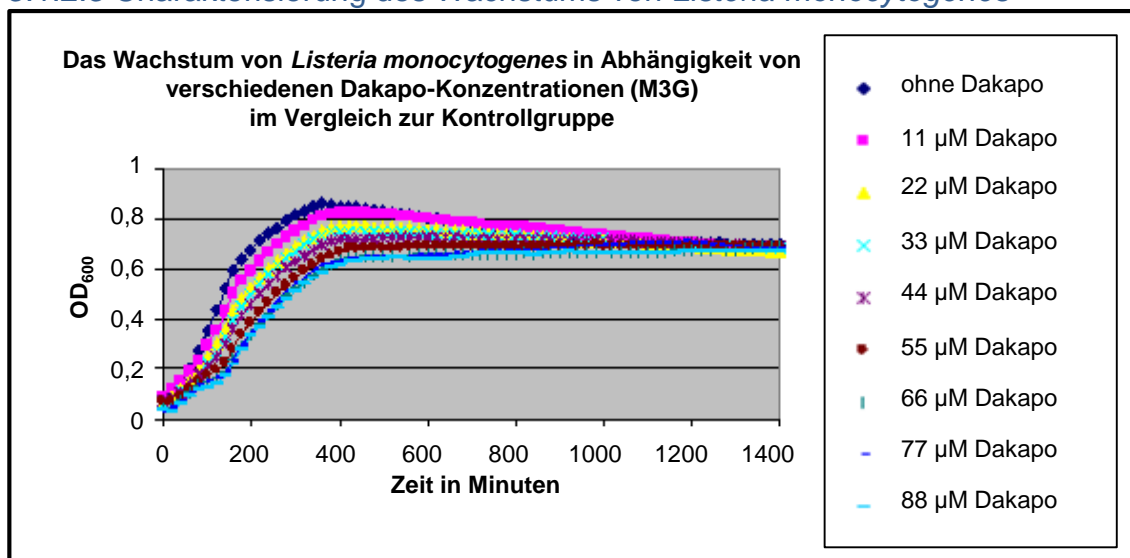


Abb. 3.1-29: *Enterococcus faecalis* V583 mit verschiedenen Dakapo-Konzentrationen in halblogarithmischer Darstellung

Anhand dieser halblogarithmischen Darstellung (Abb. 3.1-29) wird explizit die vorhandene Abhängigkeit des Wachstums von *Enterococcus faecalis* V583, basierend auf den unterschiedlichen Dakapo-Konzentrationen, verdeutlicht. Im Gegensatz zu *EHEC 1017* verhält sich das Wachstum von *Enterococcus faecalis* V583 jedoch genau entgegengesetzt. Je höher die Konzentration von Dakapo in  $\mu\text{M}$  ist, desto geringer ist die  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  und damit die Inhibition des Wachstums der Bakterien.

### 3.1.2.3 Charakterisierung des Wachstums von *Listeria monocytogenes*



**Abb. 3.1-30: *Listeria monocytogenes* mit verschiedenen Dakapo-Konzentrationen**

Auch im Falle von *Listeria monocytogenes* ist bereits von Beginn an ein von der Anthocyan-Konzentration abhängiges Wachstum (Typ III, siehe Abbildung 3.1-1) zu erkennen (Abb. 3.1-30). Besonders deutlich wird dies in der logarithmischen Phase zwischen der 100. und der 400. Minute. Die im Anschluss einsetzende stationäre Phase bzw. Absterbephase zeigt für die Konzentrationen von 0 bis 77 µM hingegen eine Regression zurück auf das Niveau der Wachstumskurve mit 88 µM. Für die ergänzende Darstellung wurde der Zeitpunkt „260. Minute“ gewählt (Abb. 3.1-31). Die Werte der OD<sub>600</sub> sind der Tabelle 3.1-5 zu entnehmen.

**Tab. 3.1-5: OD<sub>600nm</sub>-Werte für *Listeria monocytogenes* in der 260. Minute**

Dakapo-Konzentration in µM (basierend auf M3G)	Werte der OD <sub>600</sub> in nm (zum Zeitpunkt 260. Minute)
0	0,7691
11	0,7000
22	0,6351
33	0,6137
44	0,5740
55	0,5028
66	0,4613
77	0,4708
88	0,4454



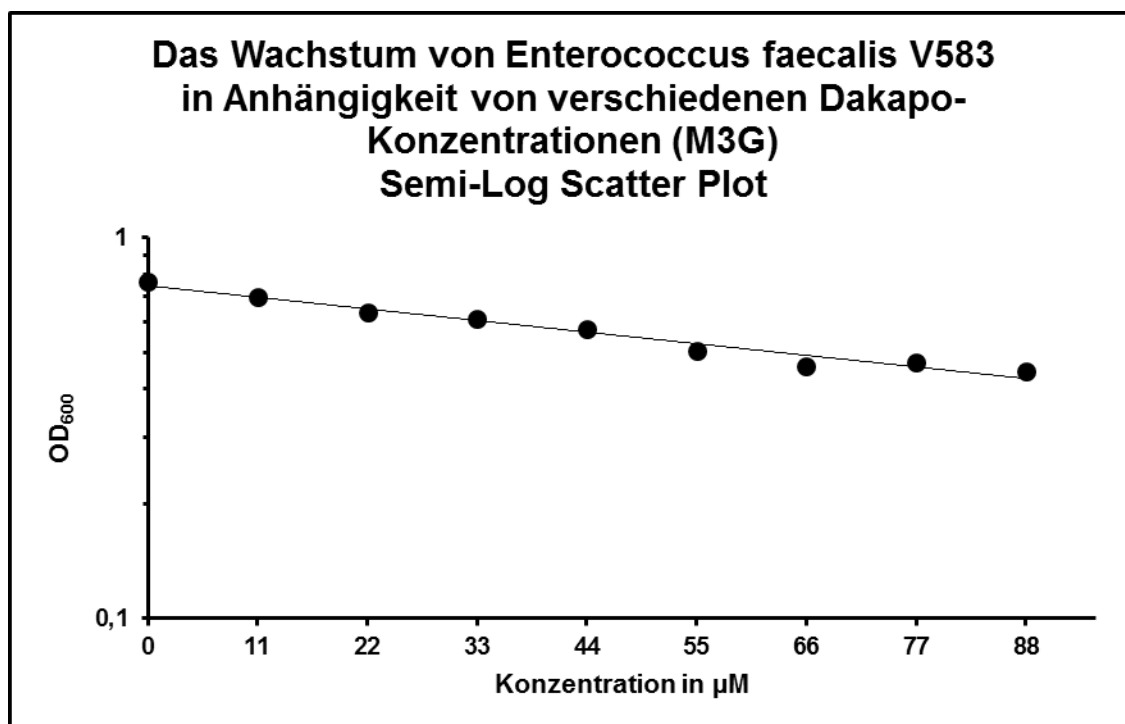


Abb. 3.1-31: *Listeria monocytogenes* mit verschiedenen Dakapo-Konzentrationen in halblogarithmischer Darstellung

Anhand dieser halblogarithmischen Darstellung (Abb. 3.1-31) wird noch einmal die vorhandene Inhibition von *Listeria monocytogenes*, basierend auf den unterschiedlichen Dakapo-Konzentrationen, verdeutlicht. Je höher die Konzentration in  $\mu\text{M}$  ist, desto ausgeprägter ist der Rückgang des Wachstums. Die Gerade weist auch hier nur eine gering ausgeprägte negative Steigung auf, was insgesamt wiederum nur für eine mäßige Inhibition des Bakterienwachstums von *Listeria monocytogenes* spricht.

### 3.2 Beeinflussung der humanen Darm-Mikrobiota-Zusammensetzung durch anthocyanhaltige-Saftgabe

Um den Einfluss der 3 verschiedenen Säfte auf die Darm-Mikrobiota zu untersuchen wurden die Stuhlproben von insgesamt 30 Probandinnen analysiert. Drei Grafiken wurden ausgewählt, welche jeweils 2 Kurven beinhalten. Die 1. Kurve zeigt das Bakterienspektrum der Darm-Mikrobiota vor und die 2. stellt das Spektrum nach der 14-tägigen Saftintervention dar. Zur Kontrolle lief parallel jeweils ein Standard mit. Die für die x-Achse gewählte Unterteilung von 0 bis 18 Minuten ermöglicht ein Ablesen der Peaks zu bestimmten Zeitpunkten und ermöglicht so eine Aussage darüber, wann identische 16S rDNA-Fragmente detektiert wurden.

Die y-Achse, welche die Einheit „Absorbance in Millivolt“ trägt, ist in Zweiserschritten von -2 bis +16 bzw. -4 bis +28 bzw. +38 unterteilt. In diesem Falle kann abhängig von der Höhe und Breite des Peaks eine allgemeine Darstellung erfolgen, wie groß der Anteil einer bestimmten Bakterienspezies bezogen auf die Bakterien-Gesamtanzahl in der Probe ist. Die Einteilung und Bewertung der Kurven erfolgte nach den u. g. Kriterien (Tab. 3.2-1).

**Tab. 3.2-1: Bewertungskriterien der Kurvenzusammensetzung der Stuhlproben-profile nach DHPLC-Analyse**

Bezeichnung	Bemerkungen	Differenz der Kurven
+++	Entspricht einem Unterschied der Kurven von	$\geq 6$ mV/min
++	Entspricht einem Unterschied der Kurven von	$\geq 4$ mV/min
+	Entspricht einem Unterschied der Kurven von	$\geq 2$ mV/min
+/-	Entspricht einem Unterschied der Kurven von	$\geq 1$ mV/min
0	entspricht „Deckungsgleichheit“ der Kurven	0
-	Entspricht einem Unterschied der Kurven von	$\leq 2$ mV/min
--	Entspricht einem Unterschied der Kurven von	$\leq 4$ mV/min
---	Entspricht einem Unterschied der Kurven von	$\leq 6$ mV/min

### 3.2.1 Betrachtung des Einflusses der anthocyanhaltigen-Säfte auf die Zusammensetzung der humanen Darm-Mikrobiota

Um einen repräsentativen Überblick über die Auswertung der Stuhlprobenprofile der insgesamt 30 Teilnehmerinnen zu geben wurde die Tabelle 3.2-2 erstellt.

**Tab. 3.2-2: Bewertung der Stuhlprobenprofile der Interventionsstudie bei einer Absorbance von 16 mV**

Die Saft-Nummerierung war wie folgt vergeben: Saft 1 – Smoothie (Dakapo/Heidelbeere), Saft 2 – Placebo, Saft 3 – Saft (Dakapo/Heidelbeere). Nicht eingereichte Proben der Probandinnen wurden in der Tabelle dementsprechend (Probe fehlt) gekennzeichnet

Probandin	Reihenfolge der Säfte	Effekt 1. Intervention	Effekt 2. Intervention	Effekt 3. Intervention
10	1-2-3	+++	+++	+++
11	2-3-1	---	--	+++
12	3-1-2	+	++	+++
13	1-3-2	+	--	+++
14	2-1-3	+	+/-	+
15	3-2-1	++	+/-	++
16	1-2-3	---	+	+/-
17	2-3-1	+++	--	+++
18	3-1-2	+++	++	+/-
19	1-3-2	+/-	--	+++
20	1-3-2	+/-	+++	Probe fehlt
21	3-2-1	+/-	+/-	++
22	1-2-3	-	+/-	+
23	2-3-1	+	+/-	+/-
24	3-1-2	-	--	+/-
25	1-3-2	---	+	+++
26	2-1-3	+/-	++	-
27	3-2-1	+	++	+
28	1-2-3	+	+/-	--
29	2-3-1	+	+	--
30	3-1-2	+	-	Probe fehlt
31	1-3-2	+	+/-	-
32	2-1-3	+	+/-	+/-
33	3-2-1	++	Probe fehlt	+++
34	1-2-3	++	+	++
35	2-3-1	Probe fehlt	+++	--
36	3-1-2	+++	Probe fehlt	+++
37	1-3-2	+/-	-	---
38	2-1-3	+/-	+++	---
39	3-2-1	+/-	++	-

### 3.2.2 Stuhlprobenprofile fünf ausgewählter Probandinnen

Die fünf Probandinnen 13, 24, 25, 28 und 38 wurden ausgewählt, um anhand ihrer vielseitigen Profile einen repräsentativen Überblick über die Auswertung der Stuhlprobenprofile der insgesamt 30 Teilnehmerinnen zu geben. Bis auf in zwei Fällen (Probandinnen 13 und 25) differiert die Reihenfolge der Saftgabe in den drei jeweiligen Interventionen der ausgewählten Probandinnen.

#### Probandin Nr. 13

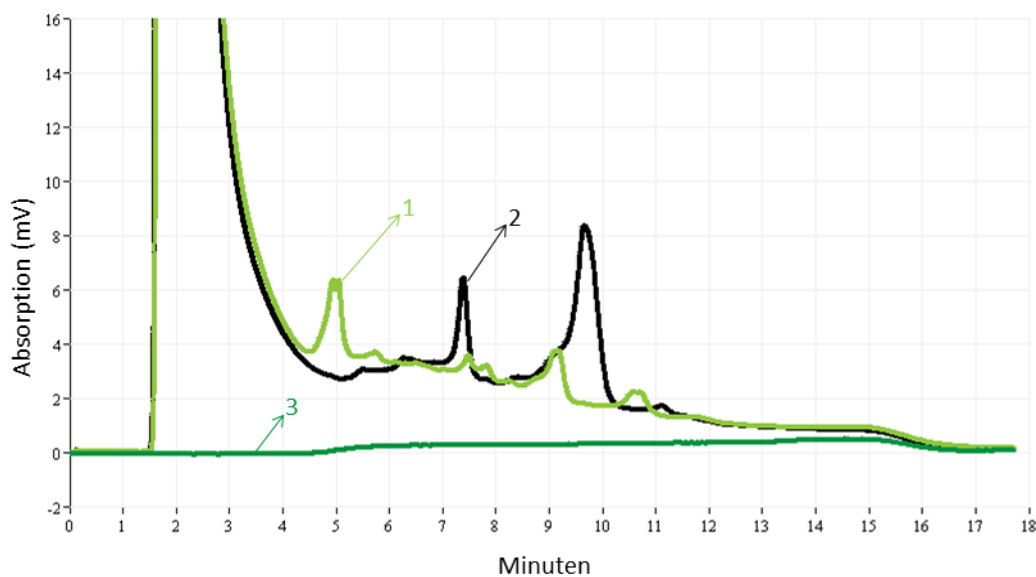
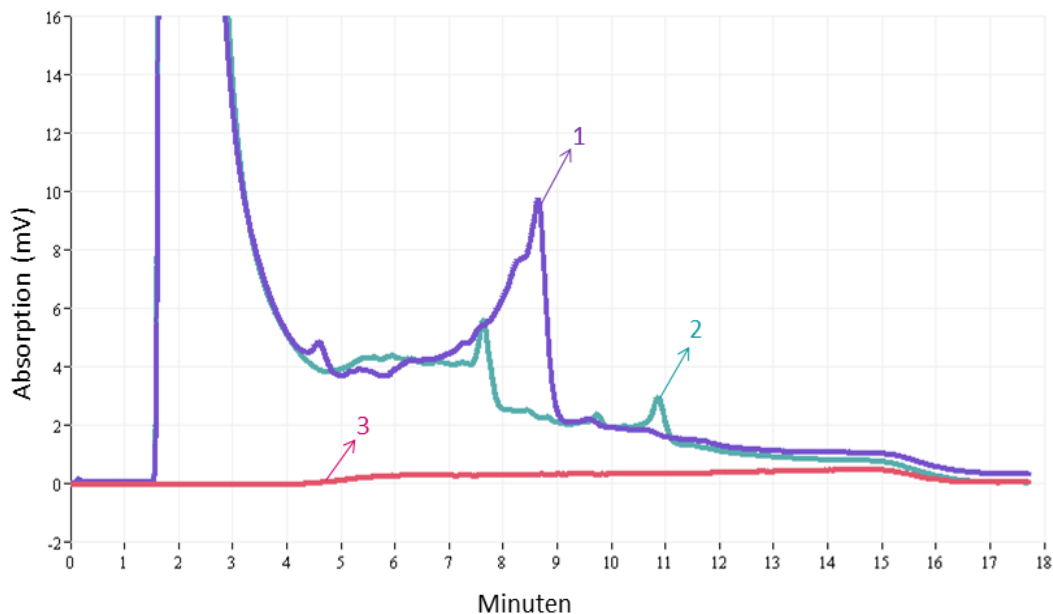


Abb. 3.2-1: Stuhlproben-Profile der Probandin 13 vor (1) und nach (2) der 1. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)

#### Kurvenbesprechung vor und nach der 1. Intervention: Smoothie

Die grüne Kurve (Stuhlprobe vor (1) der 1. Intervention in Abb. 3.2-1) weist 4 Peaks nach der 5. (ca. 6 mV), zwischen der 7. und 8. (ca. 4 mV), in der 9. (ca. 4 mV) und zwischen der 10. und 11. (ca. 2 mV) Minute auf. Die Absorbance liegt größtenteils unter vier Millivolt.

Im Vergleich hierzu zeigt die schwarze Kurve (Stuhlprobe nach (2) Intervention mit dem Smoothie in Abb. 3.2-1) nur noch 2 Peaks auf, die aber im Vergleich wesentlich deutlicher hervortreten. Der Peak nach 5. Minuten ist nicht mehr vorhanden. Hierfür scheinen sich die Peaks zwischen der 7. und 8., sowie in der 9. Minute in ihrer Höhe annähernd vervierfacht zu haben. Letzter verfügt über eine Absorbance von bis zu ca. neun Millivolt.

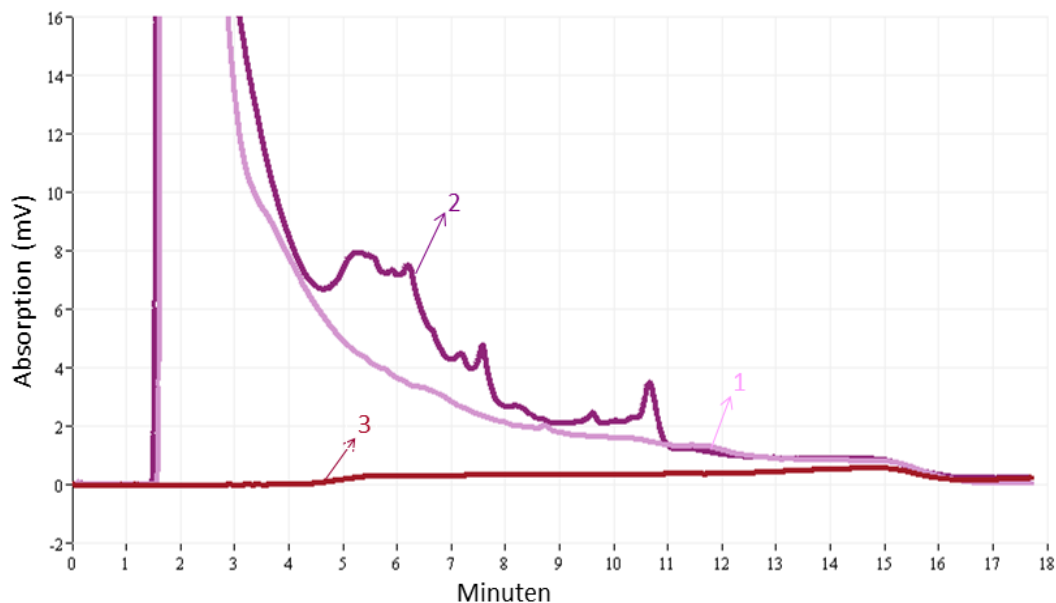


**Abb. 3.2-2: Stuhlproben-Profile der Probandin 13 vor (1) und nach (2) der 2. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)**

### **Kurvenbesprechung vor und nach der 2. Intervention: Saft**

Im 2. Interventionsabschnitt weist die lila Kurve (Stuhlprobe vor (1) der 2. Intervention in Abb. 3.2-2) einen deutlichen Peak (ca. 10 mV) zwischen der 6. und 9. Minute auf. Es besteht kaum Ähnlichkeit zur grünen Kurve der 1. Intervention (Abb. 3.2-1).

Das Absorbance-Niveau liegt überwiegend unter 5 Millivolt. Die türkise Kurve (Stuhlprobe nach (2) der 2. Intervention mit dem Heidelbeere-Dakapo-Saft in Abb. 3.2-2) zeigt einen Peak (ca. 5 mV) zwischen der 7. und 8. Minute. Zusätzlich hierzu sind zwei kleine neu aufgetretene Peaks zwischen der 9. und 10., sowie zwischen der 10. und 11. Minute zu erkennen.



**Abb. 3.2-3: Stuhlproben-Profile der Probandin 13 vor (1) und nach (2) der 3. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)**

### **Kurvenbesprechung vor und nach der 3. Intervention: Placebo**

Die hell-lila Kurve (Abb. 3.2-3) im 3. Interventionsabschnitt (Stuhlprobe (1) vor der 3. Intervention) weist, bis auf einen sehr kleinen Peak nach ca. 9 Minuten, keine weiteren Besonderheiten auf. Dies spricht dafür, dass in dieser Probe keine bakterielle DNA nachweisbar war. Die Absorbance fällt kontinuierlich ab, um sich nach 18 Minuten dem Niveau der Standardkurve anzupassen.

Das Profil der 2. Stuhlprobe nach der 3. Intervention mit dem Placebosaft zeigt im Vergleich mehrere kleine, jedoch deutliche Peaks auf (dunkel-lila Kurve (2) in Abb. 3.2-3). Die Peaks zwischen der 7. und 8. und 10. und 11. Minute spiegeln möglicherweise die 2 Peaks der türkisen Kurve (Stuhlprobe nach (2) der 2. Intervention Abb. 3.2-2) wider. Die Absorbance überschreitet 8 Millivolt im gesamten Verlauf nicht.

### 3.2.1.2 Probandin Nr. 24

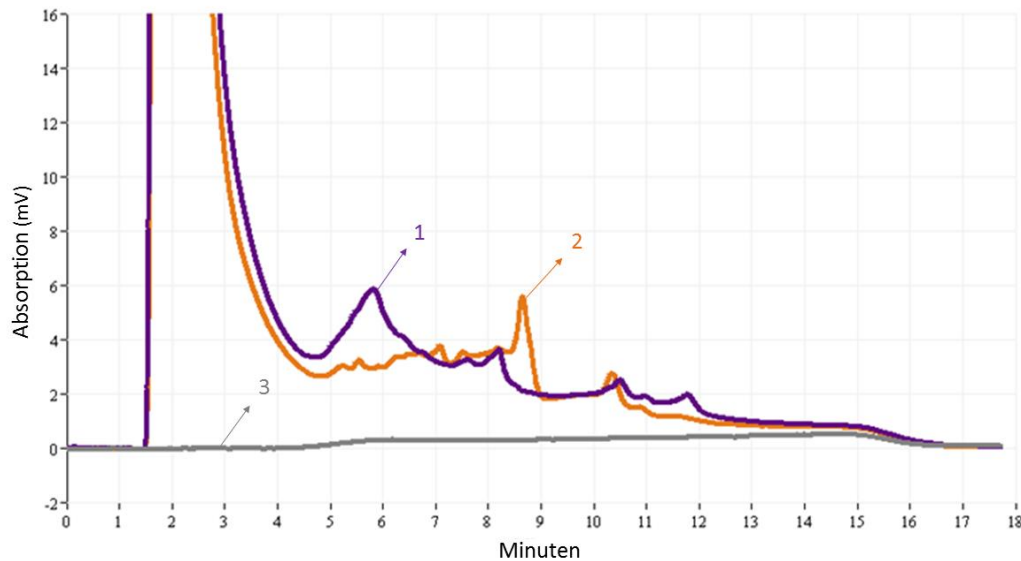
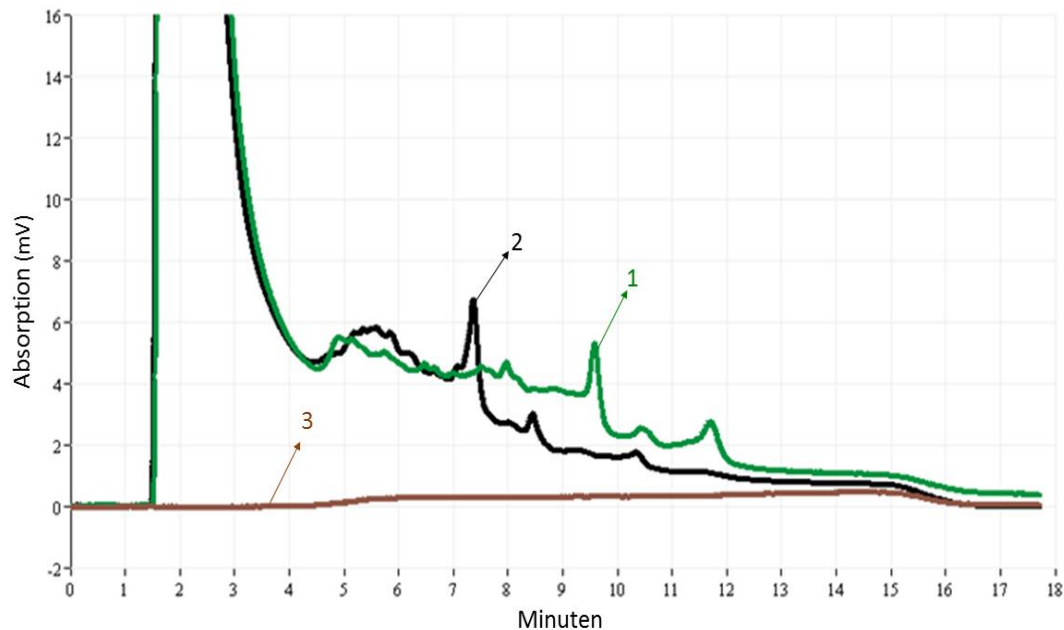


Abb. 3.2-4: Stuhlproben-Profile der Probandin 24 vor (1) und nach (2) der 1. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)

#### Kurvenbesprechung vor und nach der 1. Intervention: Saft

Die lila Kurve der Probandin mit der Nummer 24 repräsentiert das Spektrum der Stuhlprobe vor (1) der 1. Saftintervention (Abb. 3.2-4). Diese Kurve weist 4 deutliche Peaks nach 6, 8 sowie zwischen der 10. und 11. und in der 12. Minute auf, wobei der Peak nach 6 Minuten die höchste Absorbance-Rate mit 4 bis 6 Millivolt zeigt.

In der orangenen Kurve (Abb. 3.2-4), welche das Bakterienspektrum nach (2) der 1. Saftintervention zeigt, sind 2 deutliche Peaks zwischen der 8. und 9. (ca. 4 mV) Minute und zwischen der 10. und 11. (ca. 3 mV) Minute zu sehen. Die beiden Kurven besitzen im Vergleich kaum Ähnlichkeiten bzgl. des Verlaufs und der Peaks.



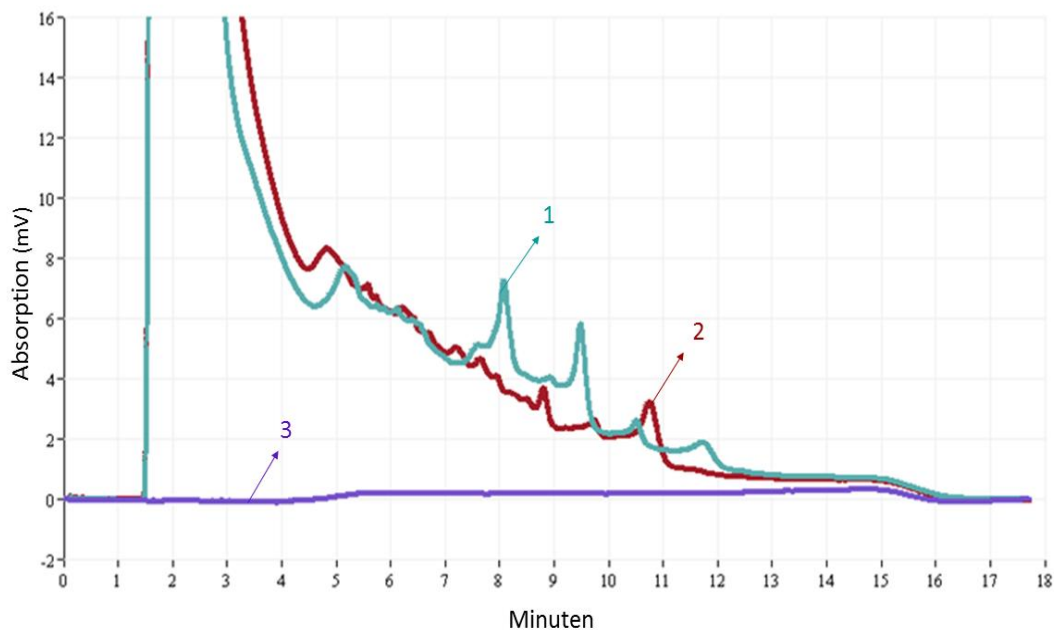
**Abb. 3.2-5: Stuhlproben-Profile der Probandin 24 vor (1) und nach (2) der 2. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)**

### **Kurvenbesprechung vor und nach der 2. Intervention: Smoothie**

Anhand der grünen Kurve soll in der Abbildung 3.2-5 das Spektrum der Stuhlprobe gezeigt werden, welches die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota vor (1) der 2. Saftintervention repräsentiert. Trotz geringer zeitlicher Verschiebung sind Parallelen zu der orangenen Kurve in der 1. Abbildung zu erkennen, wobei sich in diesem Fall ein Peak zwischen der 7. und 8. Minute deutlich hervorhebt.

Nach der 2. Intervention mit dem Smoothie zeigt sich, im Gegensatz zur Ausprägung der dunkelgrünen Kurve (Abb. 3.2-5), ein völlig anderer Verlauf bzw. eine andere Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota in der schwarzen Kurve (2). Lediglich zwischen der 10. und 11. Minute ist vermutlich der gleiche Peak nur mit unterschiedlicher Absorbance-Stärke zu erkennen.





**Abb. 3.2-6: Stuhlproben-Profile der Probandin 24 vor (1) und nach (2) der 3. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)**

### **Kurvenbesprechung vor und nach der 3. Intervention: Placebo**

Das Spektrum der Darm-Mikrobiota vor (1) der 3. Saftintervention, welches durch die türkise Kurve (Abb. 3.2-6) präsentiert wird, zeigt wiederum eine geringe Ähnlichkeit zur Kurve der 1. Saftintervention (3.2-4).

Im Vergleich zur Kurve vor (1) der 2. Saftintervention (Abb. 3.2-5), sind 4 identische Peaks nach der 8., zwischen der 9. und 10., zwischen der 10. und 11. und zwischen der 11. und 12. Minute zu erkennen. Diese weisen jedoch einen Unterschied in der Stärke der Absorbance auf.

Nach (2) der 3. Intervention mittels Placebo sind viele kleinere Peaks zwischen der 4. und 8. Minute zu erkennen. In den folgenden 3 Minuten sind jeweils 3 weitere deutliche Peaks zu erkennen. Das Absorbance-Niveau beider Kurven ist im Verlauf annähernd identisch.

### 3.2.1.1 Probandin Nr. 25

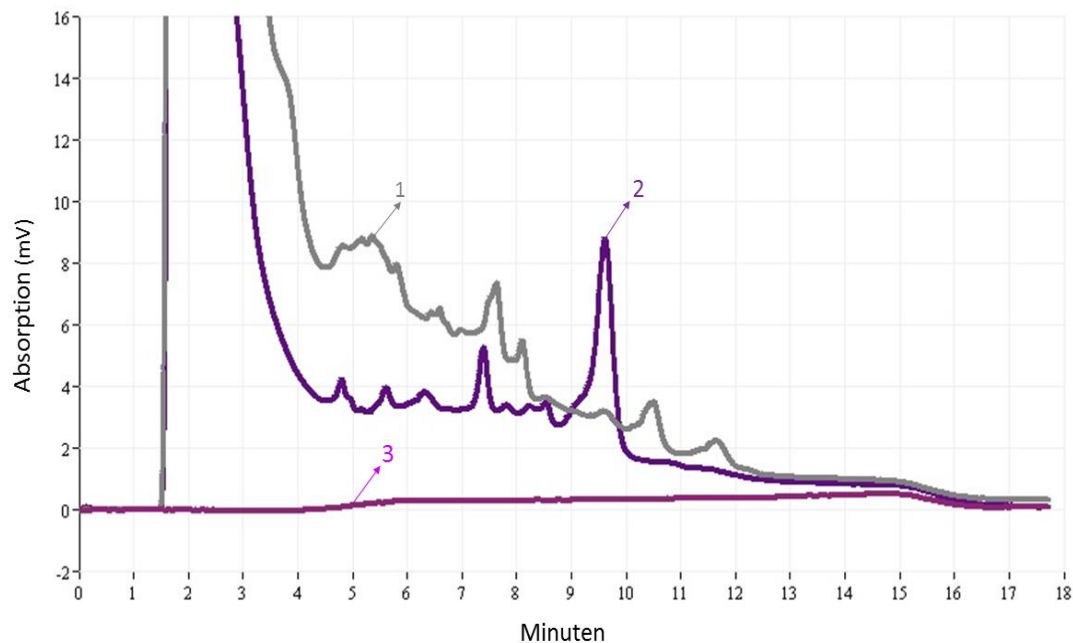
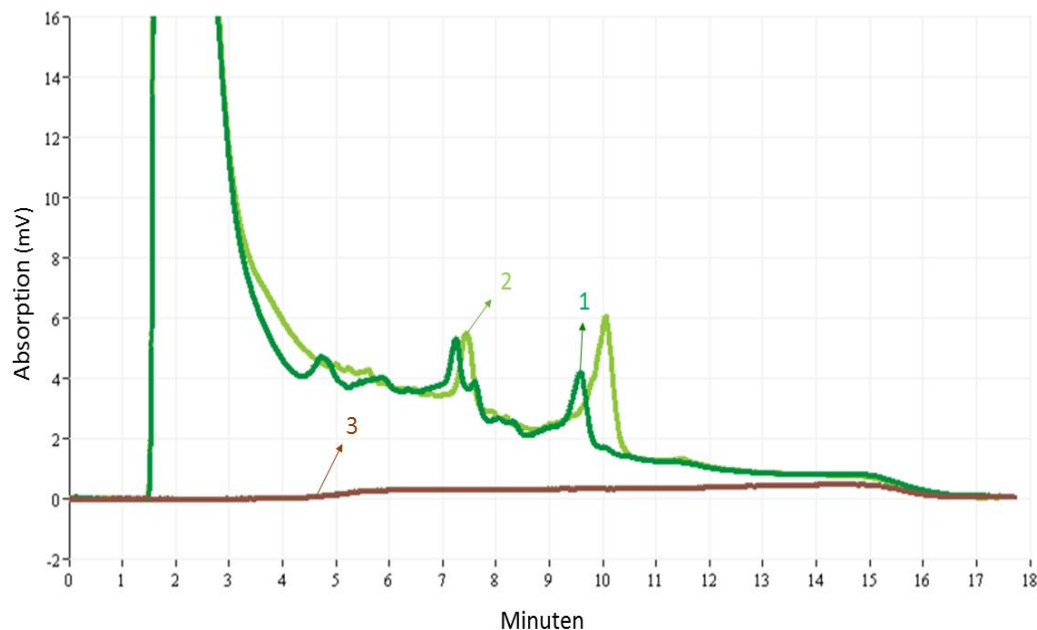


Abb. 3.2-7: Stuhlproben-Profile der Probandin 25 vor (1) und nach (2) der ersten Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)

#### Kurvenbesprechung vor und nach der 1. Intervention: Smoothie

Die graue Kurve in der Abbildung 3.2-7 zeigt das Bakterienspektrum vor (1) der 1. Saftintervention mit dem Smoothie. Zwischen der 4. und der 12. Minute sind Peaks unterschiedlicher Intensität zu erkennen, wobei das Absorbance-Niveau im Verlauf von 9 auf 1 Millivolt abfällt. Die deutlichsten Peaks liegen zwischen der 7. und 8., sowie zwischen der 10. und 11. Minute.

Die lila Kurve (Spektrum nach (2) der 1. Saftintervention Smoothie in Abb. 3.2-7) weist insgesamt ein geringeres Absorbance-Niveau auf. Bis auf 2 Peaks zwischen der 7. und 8. (ca. 5 mV), und zwischen der 9. und 10. Minute (ca. 9 mV), liegt die Absorbance unter 4 Millivolt. Im Vergleich der beiden Kurven kann gezeigt werden, dass die Bakteriendichte nach der Smoothie-Intervention abgenommen, bzw. eine Verschiebung der Speziesmenge stattgefunden hat.

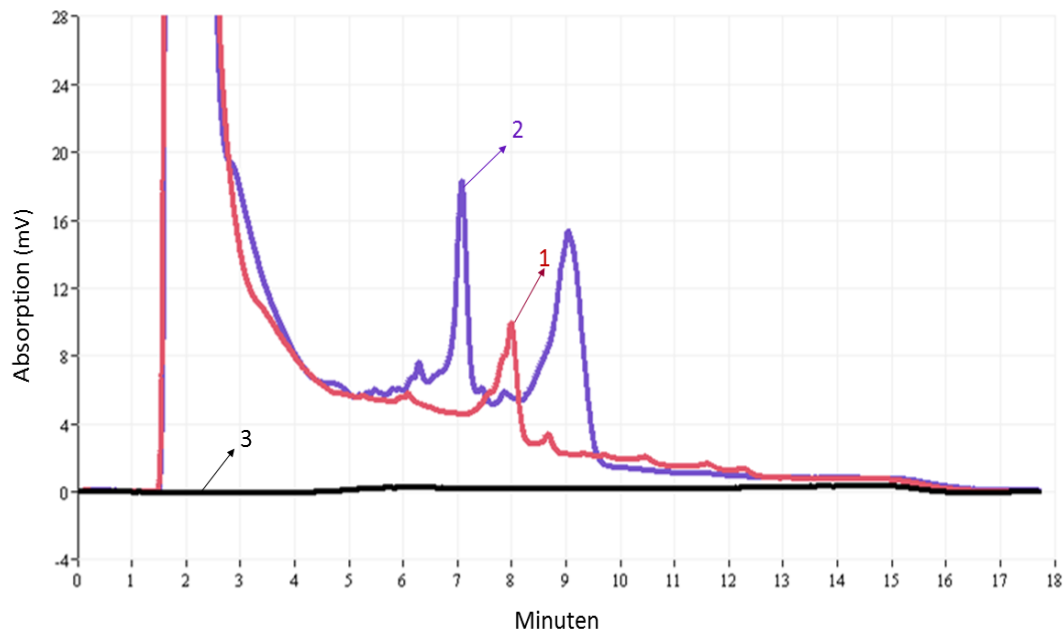


**Abb. 3.2-8: Stuhlproben-Profile der Probandin 25 vor (1) und nach (2) der 2. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)**

#### **Kurvenbesprechung vor und nach der 2. Intervention: Saft**

Anhand der dunkelgrünen Kurve (Abb. 3.2-8) wird das Bakterienspektrum der Stuhlprobe vor (1) der 2. Saftintervention dargeboten. Peaks unterschiedlicher Höhe sind zwischen der 4. und 10. Minute zu erkennen, wobei zwischen der 7. und 8. (ca. 5 mV) und zwischen der 9. und 11. (ca. 6 mV) Minute 2 Peaks deutlich hervortreten. Im Durchschnitt liegt die Absorbance unter 4 Millivolt.

Der Kurvenverlauf (hellgrüne Kurve in Abb. 3.2-8) nach (2) der 2. Intervention mit dem Heidelbeere-Dakapo-Saft zeigt im Vergleich zur dunkelgrünen Kurve einen ähnlichen Verlauf. Der Peak zwischen der 7. und 8. Minute ist annähernd identisch und auch der Peak zwischen der 9. und 10. Minute kann, leicht verschoben, wiedererkannt werden. Die Absorbance liegt auch hier im Durchschnitt unter 4 Millivolt.



**Abb. 3.2-9: Stuhlproben-Profile der Probandin 25 vor (1) und nach (2) der 3. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)**

### **Kurvenbesprechung vor und nach der 3. Intervention: Placebo**

In der Abbildung 3.2-9 wird das Bakterienspektrum der Stuhlprobe vor (1) der 3. Saftintervention durch die pinke Kurve repräsentiert. Peaks sind zwischen der 5. und der 13. Minute zu erkennen. Ein deutlicher Peak mit einer Absorbance von 10 mV befindet sich zwischen der 7. und 8. Minute. Ansonsten nimmt die Absorbance in der oben genannten Zeit kontinuierlich ab. Das Bakterienspektrum der 2. Stuhlprobe nach (2) der 3. Intervention mit dem Placebo wird durch die lila Kurve (3.2-9) dargestellt. Diese zeigt 2 deutliche Peaks in der 7. (ca. 17 mV) und der 9. (ca. 15 mV) Minute. Im Gegensatz hierzu ist der Peak zwischen der 7. und 8. Minute nicht mehr vorhanden. Peaks sind zwischen der 4. und 10. Minute zu erkennen. Insgesamt kann gezeigt werden, dass im Vergleich der beiden Kurven die Bakteriendichte nach der Placebo-Intervention zugenommen und ergänzend eine Verschiebung der Speziesmenge stattgefunden hat.

### 3.2.1.4 Probandin Nr. 28

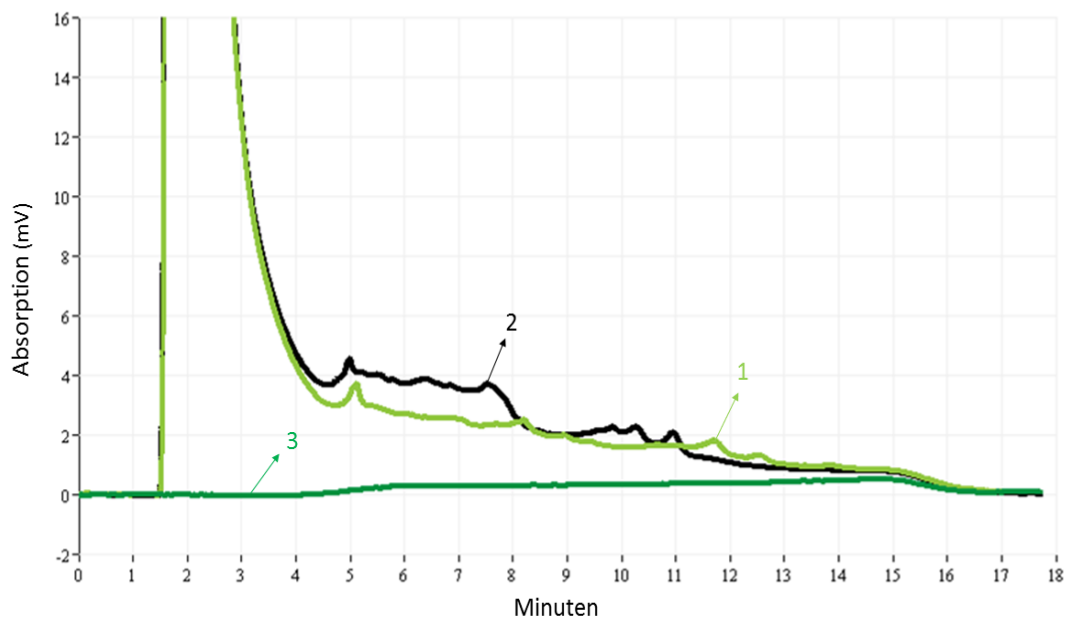
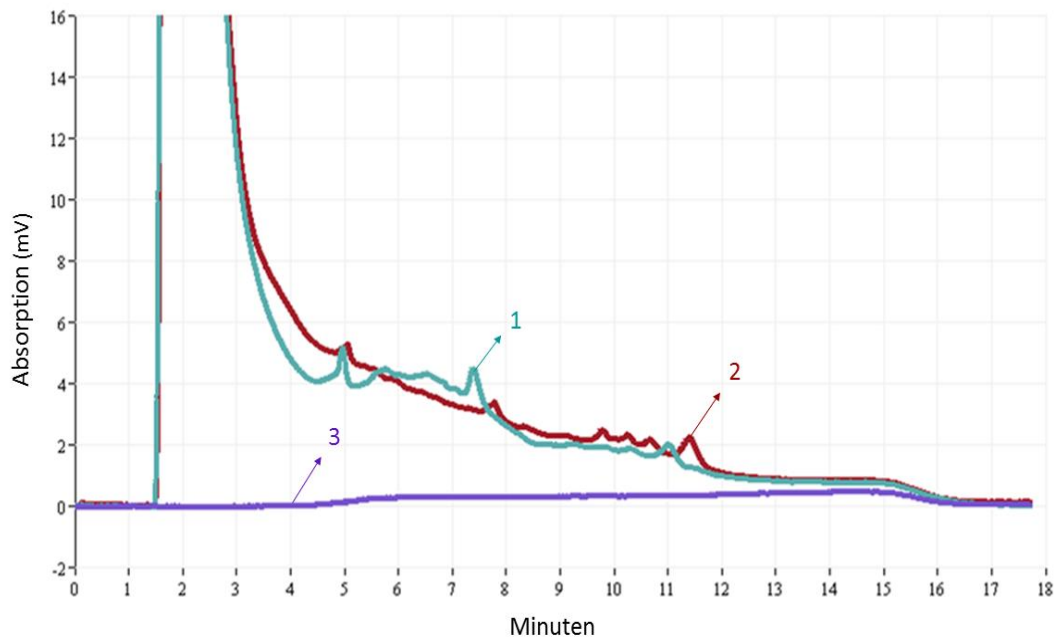


Abb. 3.2-10: Stuhlproben-Profile der Probandin 28 vor (1) und nach (2) der 1. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)

#### Kurvenbesprechung vor und nach der 1. Intervention: Smoothie

Der hellgrünen Kurve ist die Bakterienzusammensetzung der Stuhlprobe vor (1) der 1. Saftintervention zu entnehmen (Abb. 3.2-10). Peaks sind zwischen der 4. und 13. Minute zu erkennen, wobei die Absorbance während dieser gesamten Zeitspanne unter 4 Millivolt liegt. In der 5., 8. und zwischen der 11. und 12. sowie zwischen der 12. und 13. Minute befinden sich kleinere Peaks. Ergänzend kann gesagt werden, dass in der gesamten Stuhlprobe, im Vergleich zu den anderen Kurven, eine geringe Bakterienmenge vorhanden ist (siehe Probandin 13, 24 und 38). Dies ändert sich auch nach (2) der 1. Saftintervention mit dem Smoothie nicht signifikant. Die schwarze Kurve (Abb. 3.2-10) zeigt zeitweise eine Erhöhung der Absorbance, jedoch bleibt diese zwischen der 4. und 12. Minute überwiegend unter den 4 Millivolt. Nach 5 Minuten ist auch hier ein Peak, wie in der oberen Kurve beschrieben, wiederzuerkennen.

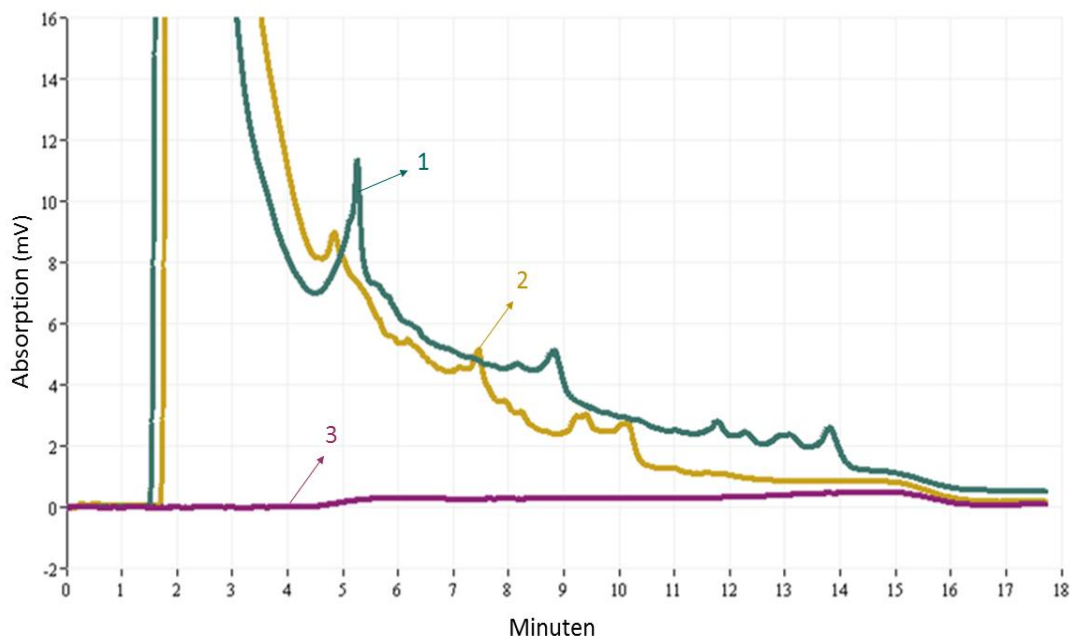


**Abb. 3.2-11: Stuhlproben-Profile der Probandin 28 vor (1) und nach (2) der 2. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)**

### **Kurvenbesprechung vor und nach der 2. Intervention: Placebo**

Das Bakterienspektrum vor (1) der 2. Saftintervention wird in der folgenden Abbildung 3.2-11 durch die türkise Kurve präsentiert. Peaks sind wiederum zwischen der 4. und 12. Minute zu erkennen, wobei die Absorbance durchgängig unter 5 Millivolt liegt. Kleinere Peaks befinden sich in der 5., zwischen der 7. und 8. und zwischen der 9. und 12. Minute. Bezüglich der gesamten Formation der Kurve sind Parallelen zu der hellgrünen Kurve vor der 1. Saftintervention zu erkennen (Abb. 3.2-10).

Mittels der roten Kurve (Abb. 3.2-11) erfolgt die Darstellung des Bakterienspektrums der Stuhlprobe nach (2) der 2. Intervention mittels Placebo. Die Absorbance bleibt im Verhältnis gering und befindet sich zwischen der 4. und 12. Minute unter 5 Millivolt. Kleinere Peaks sind in der 5., zwischen der 7. und 8. und in der 11. Minute zu erkennen.



**Abb. 3.2-12: Stuhlproben-Profile der Probandin 28 vor (1) und nach (2) der 3. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)**

#### **Kurvenbesprechung vor und nach der 3. Intervention: Saft**

Die grüne Kurve präsentiert das Bakterienspektrum vor (1) der 3. Saftintervention (siehe Abb. 3.2-12). Zwischen der 4. und der 15. Minute sind mehrere Peaks zu erkennen. Die Absorbance liegt fast durchgehend unter 8 Millivolt. Die grüne Kurve weist eine große Ähnlichkeit zu der roten Kurve in der Abbildung 3.2-11 auf. Die Peaks sind in der Abbildung 3.2-12 lediglich ausgeprägter.

Im Anschluss soll die gelbe Kurve (Abb. 3.2-12) besprochen werden, welche das Bakterienspektrum nach (2) der 3. Intervention mit dem Heidelbeere-Dakapo darstellt. Peaks sind hier zwischen der 4. und der 11. Minute zu erkennen. Die Absorbance liegt im gesamten Verlauf unter 10 Millivolt. Die Peaks der grünen Kurve treten in der gelben Kurve nicht wieder auf. Dafür sind zwischen der 4. und 5., zwischen der 7. und 8. und zwischen der 9. und 11. Minuten neue Peaks zu erkennen.

### 3.2.1.5 Probandin Nr. 38

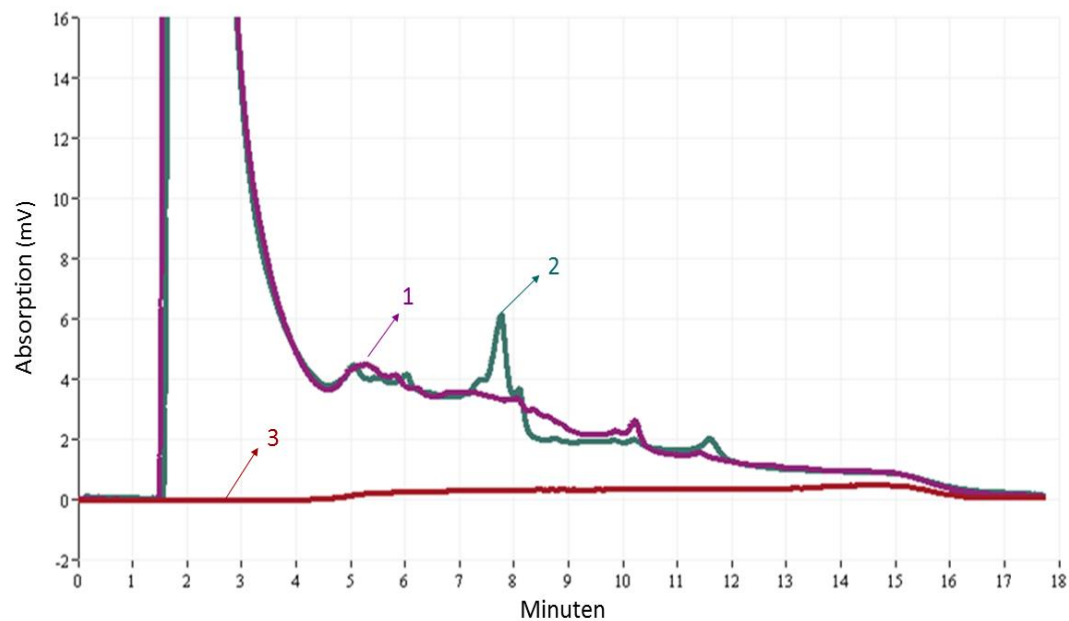


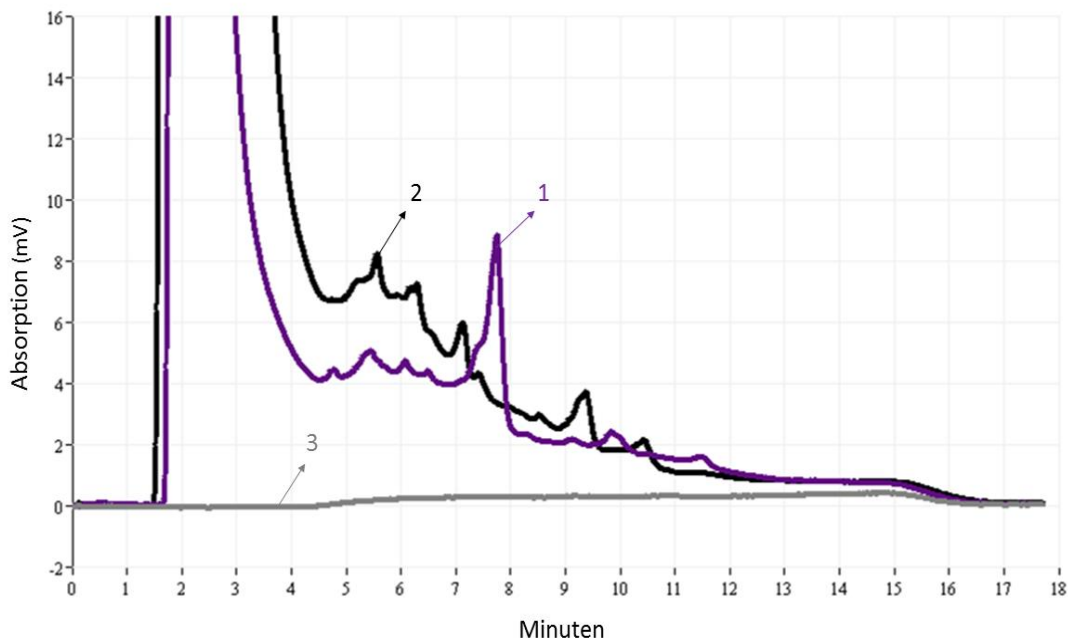
Abb. 3.2-13: Stuhlproben-Profile der Probandin 38 vor (1) und nach (2) der 1. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)

#### Kurvenbesprechung vor und nach der 1. Intervention: Placebo

Anhand der hell-lila Kurve wird das Bakterienspektrum von der Probandin 38 vor (1) der 1. Saftintervention repräsentiert (siehe Abb. 3.2-13). Peaks sind zwischen der 5. und der 12. Minute zu erkennen. Die Absorbance liegt in diesem Bereich durchgängig unter 5 Millivolt. Ein deutlicher, wenn auch kleiner Peak, existiert zwischen der 10. und der 11. Minute.

Die grüne Kurve (Abb. 3.2-13) zeigt das Bakterienspektrum nach (2) der 1. Intervention mit dem Placebo. Peaks sind hier ebenfalls zwischen der 4. und der 12. Minute zu erkennen. Die Absorbance befindet sich in dieser Zeit, außer zwischen der 7. und 8. Minute (ca. 6 mV), ebenfalls unter 5 Millivolt. Hier ist ebenfalls zu erkennen, dass trotz des Placebos eine Verschiebung der Quantität der unterschiedlichen Bakterienspezies stattgefunden hat.



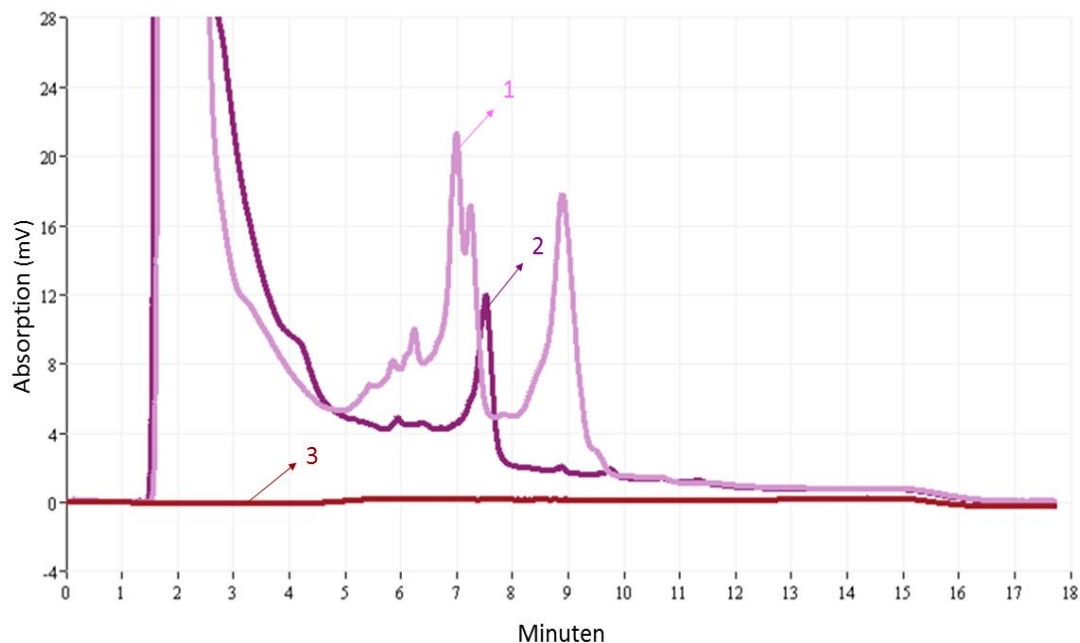


**Abb. 3.2-14: Stuhlproben-Profile der Probandin 38 vor (1) und nach (2) der 2. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)**

#### **Kurvenbesprechung vor und nach der 2. Intervention: Smoothie**

Das Bakterienspektrum vor (1) der 2. Saftintervention wird in der Abbildung 3.2-14 anhand der dunkel-lila Kurve repräsentiert. Wie in der grünen Kurve der Abbildung 3.2-13 liegt die Absorbance überwiegend unter 5 Millivolt. Lediglich zwischen der 7. und 8. Minute ist ein Peak mit einer Absorbance von ca. 9 Millivolt zu erkennen. Zwischen der 4. und 12. Minute sind auch hier Peaks unterschiedlicher Ausprägung zu finden.

Die ebenfalls in der Abbildung 3.2-14 vorhandene schwarze Kurve stellt das Bakterienspektrum nach (2) der 2. Saftintervention mit dem Smoothie dar. Hier sind zwischen der 5. und der 11. Minute Peaks verschiedener Höhe zu erkennen. Die Absorbance befindet sich über diese Zeitspanne unter 9 Millivolt. Im Vergleich zur dunkel-lila Kurve sind einige Peaks nicht aufzufinden (zwischen der 9. und 10. Minute), einige zeigen eine intensivere Ausprägung (zwischen der 5. und 7. Minute) und andere sind neu hinzugekommen (7. Minute, zwischen der 9. und 10. Minute).



**Abb. 3.2-15: Stuhlproben-Profile der Probandin 38 vor (1) und nach (2) der 3. Intervention sowie der mitlaufende Leerwert (3)**

### **Kurvenbesprechung vor und nach der 3. Intervention: Saft**

In der letzten Abbildung 3.2-15 zeigt die rosa Kurve das Spektrum der Darm-Mikrobiota vor (1) der 3. Saftintervention. Peaks sind zwischen der 4. und der 10. Minute zu erkennen. Diese kennzeichnen sich zeitweise durch eine Absorbance von bis zu ca. 21 Millivolt. Der Peak zwischen der 7. und 8. Minute ist möglicherweise in der grünen (Abb. 3.2-13) und der dunkel-lila (Abb. 3.2-14) Kurve wieder zu finden.

Die dunkel-lila Kurve in der Abbildung 3.2-15 zeigt zum Abschluss das Bakterienspektrum nach (2) der 3. Intervention mittels des Heidelbeere-Dakapo-Saftes. Peaks sind zwischen der 6. und der 10. Minute zu erkennen. Die Absorbance liegt überwiegend unter 5 Millivolt. Die einzige Ausnahme stellt ein Peak zwischen der 7. und 8. Minute dar, welcher eine Absorbance von ca. 12 Millivolt aufweist. Im direkten Vergleich mit der rosa Kurve sind keine Ähnlichkeiten zu erkennen.

## 4. Diskussion

Anthocyane besitzen, basierend auf ihrem antioxidativem Status (64, 65), multiple gesundheitsfördernde Eigenschaften. Hierzu zählen unter anderem das Abfangen von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmolekülen, welche eine oxidative Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden hervorrufen können. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das Risiko nach Konsumierung von Anthocyanen für kardiovaskuläre Erkrankungen (66-68) sowie für die Entstehung von Darmkrebs (69-71) signifikant gesenkt wird. Da diese Polyphenole jedoch außerhalb ihres natürlichen Umfeldes eine sehr geringe Halbwertszeit besitzen (72), wird vermutet, dass es die Zerfallsprodukte, bzw. die Metabolite sind, welche über den GIT in die Blutbahn aufgenommen werden und den positiven Effekt in den jeweiligen Zielgeweben hervorrufen (73, 74). Für die hierzu notwendige Metabolisierung wird ein besonderer Fokus auf die humane Darm-Mikrobiota mit ihren verschiedenen Vertretern gerichtet. Obwohl einige der Zwischenprodukte bereits identifiziert sind (75-77), liegen jedoch kaum Informationen darüber vor, wie die Anthocyane metabolisiert werden und wie sie auf vereinzelte Bakterienspezies bzw. auf die Zusammensetzung der gesamten Darm-Mikrobiota wirken. Mögliche Methoden zur Analyse dieser komplexen Mikrobiota sind unter anderem der Terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP), welcher einen Vergleich von zwei DNA-Proben bzgl. eines Polymorphismus mittels Gelelektrophorese erlaubt (78) sowie die „Temperature gradient gel electrophoresis“ (TGGE) oder „Denaturing gradient gel electrophoresis“ (DGGE). Hierbei erfolgt anhand des 16S rRNA-Abschnittes, welcher für jede Bakterienspezies individuell ist, durch zeitlich unterschiedliche Denaturierung bei variabler Sequenzvariation eine Identifizierung der bakteriellen Zusammensetzung bzw. Spezies (79). Methoden, wie die Amplifikation der 16S rRNA mittels PCR und anschließender DHPLC, welche in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, ermöglichen ebenfalls Aussagen zur Zusammensetzung der humanen Darm-Mikrobiota. Neuere Methoden, wie das „Next Generation Sequencing“ (NGS), sind in der Lage, Millionen von DNA-Fragmenten in einem einzigen Sequenzierlauf parallel zu sequenzieren und werden heutzutage zunehmend im Forschungsbereich sowie in der Diagnostik zur Entschlüsselung des gesamten Genoms eingesetzt (80, 81). Hierdurch können z. B. bakterielle Gene in kürzester Zeit analysiert und einer Spezies zugeordnet werden. Diese Methode stand zum Zeitpunkt der Arbeit aus Kostengründen jedoch noch nicht zur Verfügung. Vor Analyse der gesamtheitlichen Zusammensetzung wurde im ersten Abschnitt zunächst das Wachstumsverhalten einzelner fakultativ anaerober Spezies gesondert untersucht.

#### 4.1 Analyse des Wachstumsverhaltens ausgewählter Bakterienspezies nach Zugabe von verschiedenen anthocyanreichen Beerenextrakten

Im Folgenden sollen diese *in vitro* Ergebnisse der 29 ausgewählten fakultativ anaeroben Bakterienspezies bzw. -subspezies diskutiert und unter dem Aspekt ihrer Relevanz *in vivo* betrachtet werden. Unterschiede in Bezug auf die Bakterienmenge zu Beginn der Wachstumskurven mit und ohne Anthocyane (s. Abschnitt 3.1.1.2 und 3.1.1.3) sind möglicherweise durch eine Verzögerung der Messung des Tecan-Gerätes zu erklären. Je nach Raumtemperatur musste vorab eine Anpassung auf 37 °C erfolgen. Kam es in dieser Zeitspanne bereits zu einem Effekt durch die hinzugegebenen Anthocyane, zeigten sich differente Startpunkte zu Beginn der Messung. Die im Ergebnisteil gezeigten Grafiken dokumentieren, bezogen auf das Bakterienwachstum, sehr heterogene Ergebnisse und wurden, basierend auf ihren Unterschieden (Induktion, Inhibition, kein Effekt), in drei verschiedene Typen unterteilt (siehe Abb. 3.1-1). Diese Unterschiede im Wachstumsverhalten treten nicht nur zwischen verschiedenen Spezies, sondern auch innerhalb einer Spezies und abhängig von dem anthocyanhaltigen Beerenextrakt auf. Die Schwankungen basieren möglicherweise zum einen auf den Genomvariationen der jeweiligen Bakterienspezies bzw. Subspezies, wodurch die multiplen Anthocyane mit unterschiedlicher Effektivität metabolisiert werden können. Zum anderen variiert die Quantität der verschiedenen Anthocyane und in jedem Extrakt, abhängig von der ursprünglichen Frucht, sind differente Anthocyane vertreten (siehe „Zusammensetzungen der Extrakte“ im Anhang), welche sich auch in ihrem strukturellen Aufbau unterscheiden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben gibt es multiple Substituenten (Mono- bzw. Polysaccharide, phenolische und aliphatische Säuren) unterschiedlicher Wertigkeit des Anthocyanidingerüsts (32). In mehreren Studien (35-37) wird darüber berichtet, dass Mono- bzw. Polysaccharide abgespalten werden und eine Aufspaltung des Anthocyanidin-Heterozyklus durch die Darm-Mikrobiota zu beobachten ist. Dieser Abbau bietet eventuell einen Anhaltspunkt für die vorliegenden Wachstumsunterschiede. Es ist denkbar, dass einige Spezies, im Gegensatz zu anderen, bessere Enzymausstattungen zur Metabolisierung der verschiedenen Anthocyane besitzen und zum Beispiel einige Substituenten gegenüber anderen effektiver eliminieren bzw. verarbeiten können. Jedoch könnte auch das durch die Abspaltung von Sacchariden entstandene Anthocyanidin eine Schlüsselfunktion besitzen. Wäre es allen Bakterien wiederum möglich die unterschiedlichen Substituenten abzuspalten bzw. zu verarbeiten, so stellt eventuell die Spaltung des Anthocyanidin-Heterozyklus für einige Spezies eine nicht zu bewältigende Aufgabe dar. Diese Hypothese ließe sich beliebig für gegebenenfalls entstehende Abbauprodukte

fortführen. Eine weitere Begründung könnte in der geringen Bioverfügbarkeit von Anthocyanen liegen. Aufgrund des im Kolon vorhandenen hohen pH-Wertes (38) zerfällt möglicherweise ein Großteil der 10-100  $\mu\text{M}$  das Kolon erreichenden Polyphenole und steht für eine Metabolisierung durch die Darm-Mikrobiota in ihrer ursprünglichen Struktur nicht mehr zur Verfügung. Die Expression bestimmter bakterieller Gene erfolgt über sogenannte Operons, welche Proteine mit verwandter Funktion kodieren. Diese Abschnitte können abhängig von bestimmten Umweltfaktoren an- bzw. ausgeschaltet werden und ermöglichen somit eine Anpassung an eintretende Veränderungen (82). Liegt zum Beispiel ein bestimmtes Substrat, in diesem Falle Anthocyane bzw. deren Zerfalls- oder Abbauprodukte, vor, könnten diese sich an den aktiven Repressor binden, welcher daraufhin das Operon frei gibt. Die Gene, welche ggf. Enzyme zum Abbau der Polyphenole kodieren, können abgelesen werden und die Verwertung der Anthocyane ermöglichen. Dies ist vermutlich im Falle von *Escherichia coli*, *EHEC 1017*, *EHEC 1018*, *EHEC 1022*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia liquefaciens* und *Serratia marcescens* zutreffend. Alle diese Spezies zeigten eine Induktion des Wachstums, was möglicherweise auf eine Energiegewinnung mittels Substratabbau hinweist. Diese Zeit beanspruchende Umstellung der Genexpression könnte ebenfalls eine Erklärung dafür sein, warum es in vielen Fällen vor der eigentlichen Induktion zu einer Hemmung des Wachstums kommt.

Eine Inhibition über das gesamte gemessene Zeitintervall zeigt sich wiederum am Beispiel von *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* V583, *Enterococcus faecalis* S102, *Enterococcus faecium* und *Yersinia enterocolitica*. Möglicherweise lässt sich diese Hemmung über ein Fehlen bestimmter enzymkodierender Gene dieser Spezies zum Abbau der Anthocyane bzw. deren Zerfallsprodukte erklären. Zur gleichen Zeit könnte es zu einer Hemmung der DNA-Replikation kommen, welche sich möglicherweise wiederum auf die Zellwandsynthese und der damit verbundenen Teilungsrate auswirkt (Wirkungsweise der Antibiotika). Auch andere Studien (47, 83) haben bereits darüber berichtet, dass verschiedene Bakterienspezies durch die Zugabe von anthocyanhaltigen Beerenextrakten gehemmt werden. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen berichtete Hafidh et al., nach Zugabe von rotem Kohl, jedoch über eine Hemmung des Wachstums von *Escherichia coli* O157:H7 und *Salmonella typhimurium* (83). Dies verdeutlicht erneut, dass möglicherweise die Zusammensetzung der Anthocyane bzw. die einzelnen Komponenten unterschiedliche Wirkungen in Bezug auf das Wachstum bestimmter Bakterienspezies hervorrufen.

Um die These zu entkräften, dass die von den Anthocyanen abgespaltenen, bzw.

mittels Zerfall entstehenden freien Polysaccharide für den zu verzeichnenden Wachstumseffekt verantwortlich sind, führten wir zusätzliche Wachstumsversuche mit Zugabe von Monosacchariden durch (siehe Abb. 3.1-7-9, 3.1-15-17, 3.1-23-25). Zwar zeigte sich auch hier eine Veränderung des Wachstumsverhaltens, jedoch ist in keinem der 29 Fälle eine Ähnlichkeit im Vergleich mit den Anthocyanversuchen zu erkennen. Eine Abhängigkeit des Wachstumseffektes von den jeweiligen Zellwand-Eigenschaften (grampositiv/-negativ) des Bakteriums kann ebenfalls ausgeschlossen werden.

Allerdings lassen nicht alle Spezies nach der Inkubation mit den verschiedenen anthocyanhaltigen Beerenextrakten einen Effekt erkennen. *Providencia rettgeri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, und *Listeria monocytogenes* wiesen in Gegenüberstellung mit der Kontrollgruppe zu dem gewählten Bewertungszeitpunkt geringe bis keine Unterschiede auf. Diese Spezies scheinen weder im positiven noch im negativen Sinne durch die Anwesenheit der Anthocyane in ihrer Teilung wesentlich beeinflusst zu werden. Jedoch gab es auch hier minimale Abweichungen des Wachstums abhängig vom anthocyanhaltigen Beerenextrakt. Das Wachstumsverhalten von *Listeria monocytogenes* wurde zum Beispiel in dieser Arbeit als Typ I (kein Effekt) bewertet, da es zum gewählten Bewertungszeitpunkt zwischen der 720. – 960. Minute kaum einen Unterschied im Wachstum durch das hinzugegebene anthocyanreiche Beerenextrakt zeigte. Jedoch existierten auch hier Abweichungen nach Zugabe der verschiedenen Extrakte sowie zu einem früheren bzw. späteren Zeitpunkt. Wir wählten in dieser Arbeit den o.g. Zeitraum zur Bewertung, da dieser beim überwiegenden Anteil der getesteten Spezies den deutlichsten Unterschied im Wachstum aufwies. In zukünftigen Studien sollte jedoch auch weiterhin das Wachstumsverhalten in allen vier Phasen (Latenzphase, exponentielle Phase, stationäre Phase sowie Sterbephase) untersucht werden, um detaillierter Aussagen zum Effekt auf das Wachstum treffen zu können.

Da ein Effekt bzgl. des veränderten Wachstums in vielen Versuchen erst mit Verzögerung eintrat, stellt sich die Frage, in wieweit diese Wachstumseffekte auf die Anthocyane selbst bzw. deren Zerfallsprodukte zurückzuführen sind. Infolge der Instabilität der Anthocyane bei einem pH-Wert = 7 und im flüssigen Medium, sollten die Bakterienüberstände ggf. mittels Massenspektrometrie auf vorhandene Anthocyanreste untersucht werden. Gleichzeitig könnten mit dieser Methode neu entstandene Metabolite im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden. Für drei der fakultativen Anaerobier (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Hafnia alvei*) ist dies bereits im Institut für Ernährungswissenschaften der Justus-Liebig-Universität in Gießen untersucht worden. Hier zeigte sich in den Überständen der Kultur zwar eine Abnahme

der Anthocyane nach Inkubation mit den o.g. Subspezies, jedoch konnten keine neu entstanden Metabolite nachgewiesen werden (51). Daher sollten weitere Versuche mit unterschiedlichen Methoden erfolgen, um möglicherweise Metabolite sensitiver zu detektieren. Sind diese identifiziert, wäre eventuell ein einzelner Ansatz mit verschiedenen Bakterienspezies denkbar, um die Wachstumseffekte getrennt voneinander zu untersuchen und zu identifizieren.

Unter dem Gesichtspunkt des schnellen Zerfalls der Anthocyane sowie der frühen Aufnahme im GIT, sollte zusätzlich durch weiterführende Forschung geklärt werden, wie valide die Aussagen zu der ins Kolon gelangenden Quantität sind. Möglicherweise erreicht von den 2,7 mg/ Tag der pro Person konsumierten Anthocyane ein Anteil von weniger als 10-100  $\mu\text{M}$  das Kolon. Im Gegensatz hierzu gibt es jedoch auch wissenschaftliche Artikel, welche über millimolare Konzentrationen der Metabolite im GIT berichten (84). Da die Angaben diesbezüglich weit auseinander gehen, ist schwierig zu beurteilen, ob es sich bei den oben verwendeten Mengen um physiologische Bedingungen handelt. Die in den hier durchgeführten Versuchen eingewogenen und im Maßstab von 1:20 verdünnten Mengen von 3,4 mg/ml entsprechen in den einzelnen Versuchswells einer Konzentration im Millimolar-Bereich. Gemachte Angaben in Mikromolar bezogen sich jeweils nur auf das im Extrakt am häufigsten vorkommende Anthocyan.

Unabhängig von der Konzentration der verwendeten Anthocyane sollte untersucht werden ob und wie verschiedene Bakterien bzgl. ihres Wachstums auf die hinzugefügten Polyphenole reagieren und ob ein von der Konzentration abhängiges Wachstum besteht. Diese Frage konnte durch die unterschiedlichen Konzentrationen von 11  $\mu\text{M}$ , 22  $\mu\text{M}$ , 33  $\mu\text{M}$ , 44  $\mu\text{M}$ , 55  $\mu\text{M}$ , 66  $\mu\text{M}$ , 77  $\mu\text{M}$  und 88  $\mu\text{M}$ , bezogen auf Malvidin-3-Glucosid, bereits bestätigt werden. Jedoch zeigte sich auch, dass im Ansatz mit 11  $\mu\text{M}$  nur noch ein geringer Unterschied bzgl. des Wachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe existierte. Obwohl jener Ansatz den physiologischen Bedingungen möglicherweise am ähnlichsten ist, hätte er sich, um eine Aussage zu treffen, als Standardansatz nicht geeignet. Zudem würde ein nicht vorhandener Effekt im Wachstum nicht zwangsläufig „kein Effekt“ der Anthocyane auf die verschiedenen Bakterienspezies bedeuten. Bei gleich bleibendem Wachstum könnte es trotz alledem zu einer Änderung der Genexpression und einem Abbau der Anthocyane in verschiedene Metabolite durch die Darm-Mikrobiota kommen, welche nach Absorption über das Kolon ihren gesundheitsfördernden Effekt im Zielgewebe hervorrufen. Kuntz et al. wiesen z. B. nach Zugabe der Versuchsüberstände von *Enterococcus faecalis* und *Hafnia alvei* mit anthocyanhaltigen Beerenextrakten auf Endothelzellen einen

antientzündlichen Effekt bei leichtgradiger Entzündungsreaktion in vitro nach (51). Wie komplex die Zusammensetzung der humanen Darm-Mikrobiota sowie die Wirkung der Anthocyane auf die unterschiedlichen Spezies ist, hat sich in der Analyse der Stuhlprobenprofile vor und nach Saftintervention gezeigt, welche im Folgenden diskutiert werden soll.

#### 4.2 Bewertung der Anthocyanwirkung auf die Zusammensetzung der menschlichen Darm-Mikrobiota

Zu Beginn des Abschnittes ist anzumerken, dass die Testung der Anthocyanwirkung auf die Zusammensetzung der menschlichen Darm-Mikrobiota ausschließlich anhand von Stuhlproben weiblicher Probandinnen erfolgte. Bei Wiederholungsversuchen in der Zukunft sollten ebenfalls männlich Probanden eingeschlossen werden, um zusätzlich eine Aussage über geschlechterspezifische Unterschiede treffen zu können. Anhand von fünf ausgewählten Probandinnen wurden beispielhaft einige Ergebnisse der mittels DHPLC-Analyse erstellten Stuhlproben-Profile präsentiert. Die Analyse basiert auf der Zusammensetzung der unterschiedlichen Bakterienspezies (Qualität) sowie der Bakterienmenge (Quantität) und verdeutlicht im Vergleich untereinander noch einmal, dass jeder Mensch eine individuell zusammengesetzte Darm-Mikrobiota besitzt. Diese Formation, welche bereits im Uterus beginnt (85), ist Schwankungen unterlegen und abhängig von der Art der Geburt (vaginal, Sectio) sowie multiplen weiteren Faktoren. Laut Arumugam et al. werden grundsätzlich drei verschiedene Enterotypen bzgl. der Darm-Mikrobiota unterschieden, welche jedoch keinen Zusammenhang mit der Nationalität, dem Geschlecht, dem Alter oder dem BMI besitzen. Typ 1 setzt sich überwiegend aus Bakterien der Gattung *Bacteroides* zusammen, welche ihre Energie hauptsächlich durch Fermentation von Kohlenhydraten und Proteinen gewinnen. Beim Typ 2 ist die vorherrschende Spezies *Prevotella*. Diese ist bekannt für ihre Mucin-Verarbeitung. Typ 3, welcher am häufigsten vorkommt, setzt sich zum Großteil aus *Ruminococcus* zusammen. Hier steht die Hydrolyse mit der Aufnahme von Zuckern im Vordergrund (86). Unabhängig von dieser stationären Komponente kommt es möglicherweise im Laufe des Lebens zu Verschiebungen in der Zusammensetzung der transienten Darm-Mikrobiota aufgrund des Immunsystems, der Ernährung (Stillen, Muttermilchersatz), Ernährungsumstellungen, Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa, M. Crohn und Darmkrebs sowie Reisediarrhoe (z.B. „Montezumas Rache“), die Einnahme von verschiedenen Medikamenten (z. B. Antibiotika) und vielen weiteren Umwelteinflüssen (87, 88). Dieses spiegelt sich auch in den Profilen unserer Probandinnen wider. Obwohl alle Teilnehmerinnen vor Entnahme der ersten Stuhlprobe



den gleichen Ernährungseinschränkungen unterlagen, waren kaum Gemeinsamkeiten der Profile zu erkennen. Dieses geht auch aus der Auswertung hervor. Die Kurven des ersten, dritten und fünften Versuchstages jeder Probandin unterlagen gravierenden Schwankungen und zeigten, trotz identischer Ernährungsrestriktionen über zehn Tage vor jeder Intervention, zum Teil geringe bis keine Gemeinsamkeiten. Dies könnte zum einen den Grund haben, dass nur ein geringer Teil der Stuhlprobe für die DHPLC-Analyse verwendet wurde und in einem Anteil der Stuhlprobe andere Bakterien enthalten waren als an anderer Stelle. Eine weitere Erklärung ist, dass die Zeitspanne und die Variabilität der Lebensmittelauswahl dennoch zu groß waren. Jede Probandin wählte diese nach ihrem Geschmack aus und nahm sie an unterschiedlichen Tagen in unterschiedlichen Mengen zu sich. Möglicherweise wurden im Abschnitt vor der ersten Stuhlprobe Lebensmittel konsumiert, welche im Abschnitt vor der dritten oder fünften Stuhlprobe kaum noch verzehrt wurden oder umgekehrt. Unbekannt ist auch, wie exakt sich die Probandinnen an die Ernährungseinschränkungen hielten bzw. wie hoch die Menge der unbewusst aufgenommenen Anthocyane über den Verzehr von z. B. Fertigprodukten war. Ein anderes Problem stellt der unterschiedliche Wassergehalt in den Stuhlproben dar. Hierdurch entstanden möglicherweise beim Abwiegen Schwankungen in Bezug auf die Bakterienmenge in der jeweiligen Probe. Zu bedenken ist hier, dass die DHPLC-Analyse Profile der quantitativen bakteriellen Zusammensetzung zeigt, anhand welcher Verschiebungen der Darm-Mikrobiota dargestellt werden können. Dies geschieht jedoch ohne eine Zuordnung der einzelnen Spezies. Da die drei Kurven vor der eigentlichen Intervention bereits große Schwankungen aufwiesen, stellt sich die Frage, inwieweit ein Vergleich mit den folgenden Interventionskurven aussagekräftig ist. Denn auch die Stuhlproben-Profile zwei, vier und sechs zeichneten sich anhand einer Probandin, sowie auch innerhalb eines Saftes, durch eine hohe Variabilität aus. Ähnlichkeiten (Peaks) bestanden zwischen den Kurven jeweils vor und nach der Intervention (1 und 2, 3, und 4, 5 und 6). In der Gesamtauswertung der Kurven aller 30 Probandinnen zeigte sich nach Intervention mit dem Smoothie-Saft in 6 Fällen keine signifikante Veränderung im Profil, in 15 Fällen kam es zur Vermehrung und in 8 Fällen zu einer Verminderung der bakteriellen Gesamt-DNA. Nach Intervention mit dem Placebo-Saft, kam es in 15 Fällen zu einer Vermehrung und in 8 Fällen zu einer Verminderung der bakteriellen DNA. In 3 Fällen blieb das Profil annähernd gleich. Im Falle des Heidelbeere-Dakapo-Saftes zeigte sich in 6 Profilen eine Verminderung und in 15 Fällen eine Vermehrung der bakteriellen Gesamt-DNA. Für 9 Probandinnen blieb das Profil annähernd identisch. Da in der Intervention mit allen drei Säften große Schwankungen zu

verzeichnen waren, ist es schwierig, eine solide Aussage bezüglich des Safteinflusses zu treffen sowie eine geeignete Auswertungsmethode zu finden. Im Falle der DHPLC-Analyse war es nicht möglich, die Bewertung, wie im Falle der Wachstumskurven, zu einem bestimmten Zeitpunkt vorzunehmen, da die Peaks jeweils unterschiedliche DNA-Mengen verschiedener Bakterienspezies darstellen. Für die Bewertung wurde daher die Differenz der mV/min-Angabe der beiden jeweiligen Kurven vor und nach Intervention abgeschätzt. Um die Veränderungen der bakteriellen DNA-Quantität präziser darzustellen, wäre es möglich, basierend auf dem Bereich unter der Kurve (area under the curve), entsprechende Integrale zu bilden und die Werte der ermittelten Flächeninhalte noch einmal genauer mit einander zu vergleichen. Die Berechnung dieser Integrale war zur Zeit der Messung aus Software-technischen Gründen nicht möglich. Nach Umsetzung der Berechnung könnte anhand der Kurven eine Aussage zur Menge des Gesamtgehaltes der bakteriellen DNA des entnommenen Probevolumens getroffen werden sowie anhand der Peaks, ob es zu einer Vermehrung bzw. Verminderung einer bestimmten Spezies nach Zugabe der Säfte 1-3 kam. Weiter unklar bliebe jedoch, welche Bakterienspezies in ihrem Wachstumsverhalten beeinflusst wurde. Hierfür müsste die Sequenzierung einzelner Peaks der Interventionskurven erfolgen. Mittels DHPLC-Analyse könnten die 16S rDNA-Fragmente zu einem bestimmten Zeitpunkt gesammelt und anschließend identifiziert werden. Anhand der identifizierten Spezies wäre wiederum eine gesonderte Extrakt-Testung des Smoothie, des Placebos und der Heidelbeere-Dakapo-Saftes möglich, um eine Erkenntnis darüber zu erlangen, wie die einzelnen Bakterienspezies bzw. -spezies auf die Anthocyane in den verschiedenen eingesetzten Säften reagieren. Möglicherweise wurden einige der mittels DHPLC-Peaks detektierten Spezies bereits in dieser Arbeit (Abschnitt 3.1) auf ihr Wachstumsverhalten nach Anthocyan-Gabe getestet. Um diese jedoch in die Auswertung mit einbeziehen zu können, ist zunächst die Identifizierung der einzelnen Peaks (Bakterienspezies) der DHPLC-Analysen notwendig. Da die menschliche Darm-Mikrobiota zum größten Anteil aus obligaten Anaerobiern besteht, wäre hierfür die Etablierung einer geeigneten Methode zur Durchführung dieser Wachstumsversuche (mit und ohne Zugabe von anthocyanhaltigen Beerenextrakten) von großer Bedeutung. Im Rahmen der Vorversuche dieser Arbeit erfolgte bereits die Testung einiger Anaerobier, welche jedoch nicht in diese Arbeit mit aufgenommen wurden. Eine standardisierte Durchführung war aufgrund der anaeroben Bedingungen der obligaten Anaerobier nicht möglich. Die große Vielfalt weiterer Bakterienspezies im menschlichen GIT, die möglicherweise bis heute weder entdeckt noch identifiziert bzw. sequenziert sind, stellt

ein zusätzliches Problem dar. Gleichzeitig werden bei der PCR eventuell einige 16S rDNA-Abschnitte verlässlicher amplifiziert als andere, wobei die Anzahl der PCR-Zyklen eine bedeutende Rolle spielt. Bei lückenhafter Datenlage der Datenbank ist es möglich, dass für bestimmte 16S rDNA-Sequenzen noch kein passendes Bakterium identifiziert werden kann. Hinzu kommt, dass die Sequenzen der variablen Bereiche nur einen kleinen Abschnitt in der bakteriellen DNA darstellen und es möglicherweise andere, noch nicht bekannte Spezies gibt, welche eine annähernd identische Basenabfolge in ihrer variablen Region tragen. Hierdurch kam es eventuell in der DHPLC-Analyse zu einer Überlagerung von Peaks. Dies würde bedeuten, dass ein einzelner Peak im jeweiligen Stuhlprobenprofil nicht nur eine Bakterienspezies repräsentiert (89). Andererseits ist der 16S rDNA-Abschnitt einer Bakterienspezies heterogen (90), sodass multiple Amplifikate bzw. Peaks in der DHPLC-Analyse eine einzige bakterielle Spezies abbilden können. Eine Alternative zur Analyse stellen hier die konstitutiven Gene der RNA Polymerase  $\beta$  Untereinheit (*rpoB*) dar. Case et al. verglichen zur Herkunftsbestimmung der Bakterien die phylogenetischen und evolutionären Merkmale und fanden heraus, dass die Amplifikation der *rpoB* Untereinheit eine mindestens gleichwertige Alternative zur Bestimmung bakterieller Spezies repräsentiert (91).

Wie anhand der oben angesprochenen Themen deutlich wird, stellt die Auswertung der Stuhlproben-Profile einen sehr komplexen Sachverhalt dar. Die individuelle Reihenfolge der Saftgabe sowie die strikte Diät der Interventionsstudie, welche möglicherweise für eine Abnahme der Bakteriendichte verantwortlich ist, erschweren die Analyse zusätzlich. Eine eindeutige Aussage wird ggf. erst nach Bestimmung der einzelnen Enterotypen der Probandinnen, dann auch im Zusammenhang mit der Saftgabe, möglich. Weitere Thesen, wie zum Beispiel der Gedanke, dass durch die hohe Anthocyan-Konzentration im Smoothie ein Großteil der Bakterien inhibiert wird, der Placebo keinen Effekt auf die Darm-Mikrobiota besitzt und der Heidelbeere-Dakapo-Saft durch eine moderate Anthocyan-Konzentration eine Induktion des Bakterienwachstums hervorruft, können hier nicht bestätigt werden. Geht man davon aus, dass die Versuche im ersten Abschnitt der Arbeit sich auch in vivo übertragen lassen, dann würde sich ein viel komplexerer Effekt zeigen. Durch die Anthocyane selbst, bzw. die Produktion und Austausch von Metaboliten, welche durch den Zerfall bzw. die Degradation der Anthocyane auftreten, kommt es möglicherweise parallel zu einem Wachstum der Bakterienspezies des Typs II, während Bakterienspezies des Typs III inhibiert werden, bzw. Bakterienspezies des Typs I keinen Effekt zeigen. Diese These würde vielleicht auch die gravierenden und gegensätzlichen Schwankungen in

den Stuhlproben-Profilen erklären. Jedoch auch hier wäre der Gedanke möglich, dass die Anthocyane in ihrer physiologischen Konzentration auf das Wachstum der Bakterien direkt keinen Einfluss haben und Schwankungen innerhalb der Profile ausschließlich auf andere Umwelteinflüsse wie z. B. Medikamenteneinnahme oder eine grundsätzliche Umstellung der Ernährung (Ernährungsprotokoll) zurückzuführen sind.

Inwiefern der Versuchsaufbau der Interventionsstudie im Einzelnen physiologischen Bedingungen entspricht, ist fragwürdig. Da die 0,3 l des täglich zu trinkenden Saftes ausschließlich nur morgens zum Frühstück konsumiert werden durften, entspricht dies möglicherweise nicht dem normalen Konsum einer Person ohne Einschränkungen. Ähnlich verhält es sich mit den protokollgemäßen Essensvorgaben. Durch die Reduktion bzw. Elimination einiger Lebensmittel kam es möglicherweise schon vor der eigentlichen Intervention zu einer veränderten Zusammensetzung der transienten Darm-Mikrobiota und somit zu einer Verfälschung der Ausgangssituation.

Durch die unterschiedlichen Versuchsreihen wird deutlich, dass nicht ausschließlich die Anthocyane eine Auswirkung auf die verschiedenen Bakterienspezies haben können, sondern dass die Bakterien möglicherweise ebenfalls einen Effekt auf das Anthocyanengerüst bzw. die Metabolite haben. Dass die Zusammensetzung der menschlichen Darm-Mikrobiota eine wesentliche Rolle bei der Prävention und Entstehung multipler Erkrankungen spielt, wurde bereits durch mehrere Studien (92, 93) aufgezeigt. So ist es wahrscheinlich, dass eine erhöhte Besiedlung von *Clostridium difficile* z. B. mit einer erhöhten Rate entzündlicher Darmerkrankungen assoziiert ist (94, 95). Ein großer Anteil an Bifidobakterien besitzt dagegen häufig einen positiven Effekt auf die Barrierefunktion des Darms und beugt so der Entstehung von Allergien und Diarrhoen vor und führt zu einer Immunstimulation (96). Da die Mikrobiota jedes Menschen jedoch eine individuelle Zusammensetzung aufweist, ist es schwierig, eine Aussage bzgl. der gesundheitsfördernden Wirkung der in dieser Studie durchgeführten Versuche zu treffen. Auch das unterschiedliche Wachstumsverhalten nach Zugabe der verschiedenen anthocyanhaltigen Beerenextrakte erlaubt keine generelle Aussage. Vorerst müssen weitere Spezies mittels DHPLC-Analyse sowie wirksame Metabolite mittels Massenspektrometrie identifiziert werden, um diese im Anschluss gesondert zu testen. Ebenfalls sollten weitere Anthocyane auf ihre Wirkung einzelner Spezies der Darm-Mikrobiota getestet werden, da durch die unterschiedlichen Substituenten möglicherweise ein anderes Wachstumsverhalten beobachtet werden kann. Sind pathogene Spezies, welche eine Inhibition des Wachstum nach Anthocyanangabe aufweisen, identifiziert, könnten die Anthocyane gezielt als Therapie eingesetzt werden und so möglicherweise eine Antibiotika-ähnliche Funktion übernehmen. Alternativen zu

finden, wird aufgrund der zunehmenden Antibiotika-Resistenzen von immer größerer Bedeutung.

Ist weiterhin bewiesen, dass das Wachstum gesundheitsfördernder Spezies durch die Anthocyane unterstützt, bzw. das pathogener Keime gehemmt wird, kann so die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota in positiver Weise beeinflusst werden. Durch den gezielten Konsum von anthocyanhaltigen Speisen und Getränken können Übergewicht, Diabetes mellitus, chronische Darmerkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Alzheimer und die Entstehung von Karzinomen möglicherweise vorgebeugt und beeinflusst werden. Jedoch sind weitere Studien notwendig, um den Effekt von Anthocyanen auf die menschliche Darm-Mikrobiota und die damit einhergehenden Gesundheitseffekte zu verstehen und eine definitive Aussage zum Nutzen treffen zu können. Die in dieser Arbeit etablierten Anzuchtverfahren und Wachstumsversuche sowie die unterschiedlichen Ergebnisse, welche einen Effekt der anthocyanhaltigen Beerenextrakte nachweisen konnten, bilden jedoch eine ausreichende Grundlage, weitere Projekte zu fördern und somit vielleicht in Zukunft den gezielten Einsatz in der Medizin zu ermöglichen.

## 5. Zusammenfassung

**Einleitung:** Anthocyane, welche in vielen Obst- und Gemüsesorten zu finden sind, gehören der Gruppe der Flavonoide an und sind für den größten Anteil an wasserlöslichen Farbpigmenten verantwortlich. Diverse Substituenten, welche eine Verbindung mit dem Grundgerüst eingehen können, führen zu hunderten Strukturen in der Pflanzenwelt. Der tägliche Konsum von Anthocyanen liegt bei ca. 2,7 mg/pro Person in Deutschland. In multiplen Studien wurde bereits ein positiver Gesundheitseffekt der Anthocyane bzw. deren Metabolite diskutiert. Eine Schlüsselfunktion, in Bezug auf die Verstoffwechselung der Anthocyane, wird der humanen Darm-Mikrobiota mit ihren ca. 1000 verschiedenen Bakterienspezies zugeschrieben.

**Methoden:** In dieser Arbeit wurde das Wachstumsverhalten 29 fakultativer Anaerobier der humanen Darm-Mikrobiota nach Zugabe von anthocyanhaltigen Beerenextrakten im Vergleich zur Kontrollgruppe getestet. Ergänzend wurde untersucht, ob ein konzentrationsabhängiges Wachstum existiert. Die Analyse erfolgte mittels Messung der Optischen Dichte bei 600 nm über 24 Stunden. Im zweiten Teil wurde mittels DHPLC die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota von 30 weiblichen Probanden vor und nach Gabe eines anthocyanhaltigen Saftes, Smoothies sowie eines Placebogetränks analysiert.

**Ergebnisse:** Die Bewertung des Wachstums der 29 fakultativen Anaerobier erfolgte zwischen der 720. – 960. Minute. Hier zeigte sich für zehn Spezies eine Induktion, für fünf Spezies eine Inhibition und bei 14 nur ein geringer bis gar kein Unterschied bzgl. des Wachstums. Durch die Zugabe von verschiedenen Anthocyan-Konzentrationen zu fünf verschiedenen Spezies konnte eine Abhängigkeit des Wachstums nachgewiesen werden. Bei Bewertung der Zusammensetzung der Stuhlprobenprofile nach der jeweiligen Saftintervention zeigte sich, unabhängig von der jeweiligen Saftgabe, in 45 Fällen eine Zunahme, in 20 Fällen eine Verringerung sowie in 20 Fällen keine wesentliche Veränderung der Bakteriendichte.

**Diskussion:** Aufgrund der Komplexität der Wechselwirkungen zwischen Darm-Mikrobiota und Anthocyanen wird eine einheitliche Aussage bzgl. der Wirkung auf die Gesamtheit des menschlichen GIT anhand der o.g. Ergebnisse erschwert. Die Verstoffwechselung der Anthocyane und der damit einhergehenden gesundheitsfördernden Eigenschaften ist vielversprechend und sollte weiter untersucht werden, um in Zukunft eventuell einen gezielten Einsatz in der Medizin zu ermöglichen.

## 6. Summary

**Introduction:** Anthocyanins belong to a parent class of molecules called flavonoids and can be found in multiple fruits and vegetables. They are also responsible for a great share of water-soluble pigments. The great variety of substituents which can bind to the skeletal structure lead to hundreds of different structures in nature. In Germany the daily consumption lies around 2.7 mg/per person. Multiple studies showed the positive health effect of anthocyanins or its metabolites respectively. For metabolism of anthocyanins the human gut microbiota with its more than 1000 species holds a key function.

**Methods:** In this study we analyzed the growth behavior of 29 facultative anaerobes of the human gut microbiota with and without anthocyanin containing berry extracts. Additionally we test if there was a concentration dependent growth of bacteria after adding different concentrations of anthocyanins to five different species. By measurement of optical density (600 nm) an analysis over 24 hours was done. Additionally the composition of the gut microbiota of 30 females was analyzed by using DHPLC before and after consumption of an anthocyanin containing juice, smoothie or placebo drink.

**Results:** Growth of bacteria was evaluated during the 720. – 960. minute. In ten bacterial species we saw an induction, five showed an inhibition and in 14 species we saw only a slight or no difference in growth behavior in comparison to the control group. By using different concentrations of anthocyanins a concentration dependent growth was shown. The analyzation of the composition of the gut microbiota showed an increase of bacteria in 45 cases, a decrease in 20 cases and no changes in 20 cases after consumption of the juice, the smoothie or the placebo. Changes in growth were independent of the juice.

**Discussion:** The complexity of the interaction between human gut microbiota and anthocyanins makes it nearly impossible to take a statement about the influence that anthocyanins have on the growth of multiple bacterial species and composition of the gut microbiota. The metabolism of anthocyanins and the related health effect of them and their metabolites should be a subject for further investigation. By achieving more information about the mechanism in the future an anthocyanin related treatment might be possible and it might be a natural source for alternative medicine in the future.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

16S rDNA	DNA -Abschnitt, codiert für 16S rRNA
Abb.	Abbildung
BHI-Medium	Engl. „ <i>Brain-Heart-Infusion</i> “-Medium
AC	Anthocyane
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
C3G	Cyanidin-3-Glucosid
C3S	Cyanidin-3-Sambubiosid
CASO-Agar	Casein-Soja-Pepton-Agar
dd H <sub>2</sub> O	Engl. „ <i>Double distilled water</i> “
DHPLC	Engl. „ <i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i> “
DNA	Engl. „ <i>Deoxyribonucleic acid</i> “
DSM	Dt. Stammsammlung für Mikroorganismen
EDCC	Engl. Eugen Domann „ <i>Culture Collection</i> “
EDTA	Engl. „ <u><i>Ethylendiamintetraacetat</i></u> “
<i>EHEC</i>	<i>Enterohämorrhagischer Escherichia coli</i>
F	Engl. „ <i>Forward</i> “
GIT	Gastrointestinaltrakt
H	Hauch-Antigen
HD	Heidelbeere-Dakapo
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
HWI	Harnwegsinfekt
IgA	Immunglobulin A
l	Liter
LB- Medium	Engl. „ <i>Lysogeny Broth</i> “-Medium
LEV	Engl. „low-elution volume“
<i>LMO</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LOG	Logarithmus
LS	Laborstamm
Mr	Marker
M	Molar
M3G	Malvidin-3-Glucosid
(m)g	(Milli)Gramm



min	Minuten
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MS	Monosaccharide
MTP	Engl. „ <i>Microtiter Plate</i> “
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
nm	Nanometer
O	Oberflächenantigen
OD <sub>600nm</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OH	Hydroxygruppe/ Hydroxylgruppe
PCR	Engl. „ <i>Polymerase-Chain-Reaction</i> “
pH	Neg. dek. Log. der P <sup>+</sup> -Konzentration
PI	Patientenisolat
pmol	Pikomol
PMP	Engl. „ <i>Paramagnetic Particles</i> “
PT	Probentag
R	Engl. „ <i>Reverse</i> “
RNA	Engl. „ <i>Ribonucleic Acid</i> “
rRNA	Engl. „ <i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> “
rpm	Engl. „ <i>Rounds Per Minute</i> “
SL	Stocklösung
ssp.	Subspezies
Stabw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEAA	Engl. „ <i>Triethylammonium acetate</i> “
TSB-Medium	Engl. „ <i>Tryptic Soy Broth</i> “-Medium
UV	Ultraviolett
V	Volt
VR	Vancomycin-resistent
VT	Versuchstag

## 8. Literaturverzeichnis

1. W. L. Hao, Y. K. Lee, Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol Biol* **268**, 491 (2004).
2. C. T. Yeh, G. C. Yen, Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* **51**, 1474 (Feb 26, 2003).
3. E. G. Zoetendal, A. D. L. Akkermans, W. M. A.-v. Vliet, J. A. G. M. d. Visser, W. M. d. Vos, The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health and Disease* **13**, 129 (2001).
4. A. Vrieze *et al.*, The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia* **53**, 606 (Apr, 2010).
5. C. Palmer, E. M. Bik, D. B. DiGiulio, D. A. Relman, P. O. Brown, Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* **5**, e177 (Jul, 2007).
6. K. C. Mountzouris, A. L. McCartney, G. R. Gibson, Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br J Nutr* **87**, 405 (May, 2002).
7. A. M. O'Hara, F. Shanahan, The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* **7**, 688 (Jul, 2006).
8. A. Mandavilli, Straight from the gut. *Nature* **453/29**, 581 (2008).
9. R. Trenchel *et al.*, Fungal colonization and invasive fungal infections following allogeneic BMT using metronidazole, ciprofloxacin and fluconazole or ciprofloxacin and fluconazole as intestinal decontamination. *Bone Marrow Transplant* **26**, 993 (Nov, 2000).
10. G. W. Tannock, D. C. Savage, Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun* **9**, 591 (Mar, 1974).
11. E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, W. M. de Vos, A microbial world within us. *Mol Microbiol* **59**, 1639 (Mar, 2006).
12. F. Guarner, J. R. Malagelada, Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**, 512 (Feb 8, 2003).
13. F. Shanahan, The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **16**, 915 (Dec, 2002).
14. D. Hollander, Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep* **1**, 410 (Oct, 1999).
15. G. Tetz, V. Tetz, Bacteriophage infections of microbiota can lead to leaky gut in an experimental rodent model. *Gut Pathog* **8**, 33 (2016).
16. M. Alam, T. Midtvedt, A. Uribe, Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand J Gastroenterol* **29**, 445 (May, 1994).
17. J. I. Gordon, L. V. Hooper, M. S. McNevin, M. Wong, L. Bry, Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. *Am J Physiol* **273**, G565 (Sep, 1997).
18. V. Gaboriau-Routhiau *et al.*, The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* **31**, 677 (Oct 16, 2009).
19. M. M. Kosiewicz, A. L. Zirnheld, P. Alard, Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. *Front Microbiol* **2**, 180 (2011).

20. M. Blaut, T. Clavel, Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr* **137**, 751S (Mar, 2007).
21. A. Langdon, N. Crook, G. Dantas, The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med* **8**, 39 (Apr 13, 2016).
22. B. Sanchez *et al.*, Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res*, (Aug 8, 2016).
23. S. K. Mazmanian, J. L. Round, D. L. Kasper, A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* **453**, 620 (May 29, 2008).
24. M. Bajzer, R. J. Seeley, Physiology: obesity and gut flora. *Nature* **444**, 1009 (Dec 21, 2006).
25. E. Scarpellini *et al.*, Gut microbiota and obesity. *Intern Emerg Med* **5 Suppl 1**, S53 (Oct, 2010).
26. H. Majamaa, E. Isolauri, M. Saxelin, T. Vesikari, Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **20**, 333 (Apr, 1995).
27. G. W. Tannock *et al.*, Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2578 (Jun, 2000).
28. J. A. Vanderhoof, S. H. Mitmesser, Probiotics in the management of children with allergy and other disorders of intestinal inflammation. *Benef Microbes* **1**, 351 (Nov, 2010).
29. R. D. Mattes, P. M. Kris-Etherton, G. D. Foster, Impact of peanuts and tree nuts on body weight and healthy weight loss in adults. *J Nutr* **138**, 1741S (Sep, 2008).
30. J. R. Ricketts, M. J. Rothe, J. M. Grant-Kels, Nutrition and psoriasis. *Clin Dermatol* **28**, 615 (Nov-Dec, 2010).
31. A. Denny, J. Buttriss, Synthesis Report No 4: Plant Foods and Health: Focus on Plant Bioactives. *EuroFIR Project Management Office/British Nutrition Foundation, London*, (2007).
32. B. Watzl, K. Briviba, G. Rechkemmer, Anthocyanins. *Ernahrungs-Umschau* **49**, 148 (Apr, 2002).
33. T. K. McGhie, M. C. Walton, The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res* **51**, 702 (Jun, 2007).
34. N. Motohashi, J. J. Aaron, *Bioactive heterocycles VII : flavonoids and anthocyanins in plants, and latest bioactive heterocycles II*. Topics in heterocyclic chemistry, (Springer, Berlin, 2009), pp. xi, 236 p.
35. A. M. Aura *et al.*, In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur J Nutr* **44**, 133 (Mar, 2005).
36. K. Keppler, H. U. Humpf, Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorgan Med Chem* **13**, 5195 (Sep 1, 2005).
37. S. C. Forester, A. L. Waterhouse, Identification of Cabernet Sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *J Agric Food Chem* **56**, 9299 (Oct 8, 2008).
38. N. P. Seeram, L. D. Bourquin, M. G. Nair, Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *J Agric Food Chem* **49**, 4924 (Oct, 2001).

39. J. Fleschhut, F. Kratzer, G. Rechkemmer, S. E. Kulling, Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr* **45**, 7 (Feb, 2006).
40. X. Wu *et al.*, Phenolic acids in black raspberry and in the gastrointestinal tract of pigs following ingestion of black raspberry. *Mol Nutr Food Res* **53 Suppl 1**, S76 (May, 2009).
41. T. Lapidot, S. Harel, B. Akiri, R. Granit, J. Kanner, PH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *J Agric Food Chem* **47**, 67 (Jan, 1999).
42. M. H. Choi, S. M. Shim, G. H. Kim, Protective effect of black raspberry seed containing anthocyanins against oxidative damage to DNA, protein, and lipid. *J Food Sci Technol* **53**, 1214 (Feb, 2016).
43. A. Basu, M. Rhone, T. J. Lyons, Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr Rev* **68**, 168 (Mar, 2010).
44. T. C. Wallace, M. Slavin, C. L. Frankenfeld, Systematic Review of Anthocyanins and Markers of Cardiovascular Disease. *Nutrients* **8**, (Jan 09, 2016).
45. L. S. Wang, G. D. Stoner, Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett* **269**, 281 (Oct 8, 2008).
46. A. S. Kristo, D. Klimis-Zacas, A. K. Sikalidis, Protective Role of Dietary Berries in Cancer. *Antioxidants (Basel)* **5**, (Oct 19, 2016).
47. C. Krawitz *et al.*, Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *BMC Complement Altern Med* **11**, 16 (2011).
48. L. Cesoniene, I. Jasutiene, A. Sarkinas, Phenolics and anthocyanins in berries of European cranberry and their antimicrobial activity. *Medicina (Kaunas)* **45**, 992 (2009).
49. J. M. Janda, S. L. Abbott, 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* **45**, 2761 (Sep, 2007).
50. P. C. Woo, S. K. Lau, J. L. Teng, H. Tse, K. Y. Yuen, Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* **14**, 908 (Oct, 2008).
51. S. Kuntz *et al.*, Inhibition of Low-Grade Inflammation by Anthocyanins after Microbial Fermentation in Vitro. *Nutrients* **8**, (Jul 02, 2016).
52. W. F. Caspary, M. Kist, J. Stein, Infektiologie des Gastrointestinaltraktes. *Buch: Springer Verlag* 557 (2006).
53. E. Domann *et al.*, Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* **41**, 5500 (Dec, 2003).
54. P. R. Murray, E. J. Baron, *Manual of clinical microbiology*. (ASM Press, Washington, D.C., ed. 9th, 2007).
55. E. Domann *et al.*, Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. *Int J Med Microbiol* **297**, 533 (Nov, 2007).
56. I. T. Paulsen *et al.*, Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**, 2071 (Mar 28, 2003).
57. L. M. Durso, J. L. Bono, J. E. Keen, Molecular serotyping of *Escherichia coli* O111:H8. *J Microbiol Methods* **69**, 381 (May, 2007).

58. P. M. Fratamico *et al.*, The complete DNA sequence and analysis of the virulence plasmid and of five additional plasmids carried by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strain H30. *Int J Med Microbiol* **301**, 192 (Mar, 2011).
59. J. Bai *et al.*, Screening of an *E. coli* O157:H7 Bacterial Artificial Chromosome Library by Comparative Genomic Hybridization to Identify Genomic Regions Contributing to Growth in Bovine Gastrointestinal Mucus and Epithelial Cell Colonization. *Front Microbiol* **2**, 168 (2011).
60. P. Glaser *et al.*, Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**, 849 (Oct 26, 2001).
61. TECAN-Group, Manual: Instruction for use for Infinite® 200 NanoQuant. (2008).
62. <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/dna-purification/>, (Stand 03.12.2011).
63. I. Transgenomic, Manual: Preinstallation Guide for the WAVE®. (2001).
64. S. Maxwell, A. Cruickshank, G. Thorpe, Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* **344**, 193 (Jul 16, 1994).
65. M. Serafini, G. Maiani, A. Ferro-Luzzi, Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr* **128**, 1003 (Jun, 1998).
66. M. H. Criqui, B. L. Ringel, Does Diet or Alcohol Explain the French Paradox. *Lancet* **344**, 1719 (Dec 24, 1994).
67. M. Gronbaek *et al.*, Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Ann Intern Med* **133**, 411 (Sep 19, 2000).
68. C. Manach, A. Mazur, A. Scalbert, Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* **16**, 77 (Feb, 2005).
69. J. C. Anderson *et al.*, Prevalence and risk of colorectal neoplasia in consumers of alcohol in a screening population. *Am J Gastroenterol* **100**, 2049 (Sep, 2005).
70. I. C. Arts, P. C. Hollman, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 317S (Jan, 2005).
71. W. Yi, J. Fischer, G. Krewer, C. C. Akoh, Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J Agric Food Chem* **53**, 7320 (Sep 7, 2005).
72. A. Scalbert, G. Williamson, Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* **130**, 2073S (Aug, 2000).
73. S. C. Forester, A. L. Waterhouse, Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics. *J Nutr* **139**, 1824S (Sep, 2009).
74. S. C. Forester, A. L. Waterhouse, Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* **58**, 5320 (May 12, 2010).
75. C. D. Kay, G. Mazza, B. J. Holub, J. Wang, Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *Br J Nutr* **91**, 933 (Jun, 2004).
76. T. Nurmi *et al.*, Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *J Agric Food Chem* **57**, 2274 (Mar 25, 2009).
77. P. Vitaglione *et al.*, Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr* **137**, 2043 (Sep, 2007).
78. S. M. Tiquia, Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis to assess microbial community structure in compost systems. *Methods Mol Biol* **599**, 89 (2010).

79. I. Dahllöf, H. Baillie, S. Kjelleberg, rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3376 (Aug, 2000).
80. J. M. Rizzo, M. J. Buck, Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)* **5**, 887 (Jul, 2012).
81. L. A. Cummings *et al.*, Clinical Next Generation Sequencing Outperforms Standard Microbiological Culture for Characterizing Polymicrobial Samples. *Clin Chem* **62**, 1465 (Nov, 2016).
82. U. Groß, Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. *Buch: Georg Thieme Verlag*, 513 (2006).
83. R. R. Hafidh *et al.*, Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J* **5**, 96 (2011).
84. G. Williamson, M. N. Clifford, Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Br J Nutr* **104 Suppl 3**, S48 (Oct, 2010).
85. K. Aagaard *et al.*, The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* **6**, 237ra65 (May 21, 2014).
86. M. Arumugam *et al.*, Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174 (May 12, 2011).
87. J. E. Berrington, C. J. Stewart, S. P. Cummings, N. D. Embleton, The neonatal bowel microbiome in health and infection. *Curr Opin Infect Dis* **27**, 236 (Jun, 2014).
88. L. Putignani, F. Del Chierico, A. Petrucca, P. Vernocchi, B. Dallapiccola, The human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatr Res* **76**, 2 (Jul, 2014).
89. K. H. Wilson, R. B. Blitchington, Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2273 (Jul, 1996).
90. E. C. Reeve, Encyclopedia of Genetics. *Buch: Routledge*, 984 (2013).
91. R. J. Case *et al.*, Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* **73**, 278 (Jan, 2007).
92. J. R. Marchesi *et al.*, The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, (Sep 2, 2015).
93. M. Kalliomäki, M. C. Collado, S. Salminen, E. Isolauri, Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr* **87**, 534 (Mar, 2008).
94. T. M. Monaghan, A. Cockayne, Y. R. Mahida, Pathogenesis of Clostridium difficile Infection and Its Potential Role in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* **21**, 1957 (Aug, 2015).
95. J. D. McCurdy *et al.*, Increased Rates of Clostridium difficile Infection and Poor Outcomes in Patients with IBD with Cytomegalovirus. *Inflamm Bowel Dis* **22**, 2688 (Nov, 2016).
96. D. A. Russell, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, C. Stanton, Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* **149**, 88 (Sep 1, 2011).
97. [http://www.phenol-explorer.eu/compounds?options\[page\]=3](http://www.phenol-explorer.eu/compounds?options[page]=3), (Stand: 13.11.2011).
98. G. Abel, Untersuchungen zur Wirkung von Anthocyanen auf die mikrobielle Metabolisierung von Lactose-13C-Ureid und Lactose-15N2-Ureid im Colon des Menschen. 120 (2014).

## Anhang

### Vorkommen von Anthocyanen in der Natur

<b>Cyanidin</b>	Rote Himbeere, Erdbeere, schwarze Gartenbohne
<b>Cyanidin 3,5-O-diglucosid</b>	schwarze Holunderbeere, Granatapfel, schwarze Gartenbohne
<b>Cyanidin 3-O-(6“-acetyl-galactosid)</b>	Blaubeere
<b>Cyanidin 3-O-(6“-acetyl-glucosid)</b>	Rotwein, Blaubeere
<b>Cyanidin 3-O-(6“-caffeoyl-glucosid)</b>	Stachelbeere
<b>Cyanidin 3-O-(6“-dioxalyl-glucosid)</b>	Brombeere
<b>Cyanidin 3-O-(6"-malonyl-3"-glucosyl-glucosid)</b>	Rohe rote Zwiebeln
<b>Cyanidin 3-O-(6"-malonyl-glucosid)</b>	Brombeere, Blutorange, roter roher Salat, rohe rote Zwiebeln
<b>Cyanidin 3-O-(6"-p-coumaroyl-glucosid)</b>	Schwarze Johannisbeere, dunkle Weintraube, Stachelbeere
<b>Cyanidin 3-O-(6"-succinyl-glucosid)</b>	Erdbeere
<b>Cyanidin 3-O-arabinosid</b>	Moosbeere, Blaubeere, Preiselbeere, Apfelbeere, Apfel
<b>Cyanidin 3-O-galactosid</b>	Moosbeere, Blaubeere, Preiselbeere, Stachelbeere, Apfelbeere, Apfel
<b>Cyanidin 3-O-glucoside</b>	Rotwein, Himbeere, Erdbeere, Moosbeere, schwarze Johannesbeere, Brombeere, Blaubeere, Preiselbeere, rote Johannesbeere, Stachelbeere, Moltebeere. Apfelbeere, Holunderbeere, Weintraube, Pfirsich und Nektarine geschält, Pflaume, süße und saure Kirsche, Blutorange, Granatapfel, schwarze Gartenbohne, rohe schwarze Olive, roter roher Salat

<b>Cyanidin 3-O-glucoside</b>	Brombeere, Blaubeere, Preiselbeere, Himbeere, Erdbeere, Moosbeere, schwarze Johannesbeere, Rote Johannesbeere, Stachelbeere, Moltebeere, Apfelbeere, Holunderbeere, Weintraube, Pfirsich und Nektarine geschält, Pflaume, süße und saure Kirsche, Blutorange, Granatapfel, schwarze Gartenbohne, rohe schwarze Olive, roter roher Salat
<b>Cyanidin 3-O-glucosyl-rutinosid</b>	Himbeere, rote Johannisbeere, Moltebeere, saure Kirsche
<b>Cyanidin 3-O-glucosyl-rutinosid</b>	Himbeere, rote Johannisbeere, Moltebeere, saure Kirsche
<b>Cyanidin 3-O-rutinosid</b>	Himbeere, Brombeere, schwarze und rote Johannisbeere, Stachelbeere, Moltebeere, schwarze Holunderbeere, süße und saure Kirsche, Pflaume, Olive
<b>Cyanidin 3-O-sambubiosid</b>	Rote Johannisbeere, schwarze Holunderbeere
<b>Cyanidin 3-O-sambubiosyl 5-O-glucosid</b>	Schwarze Holunderbeere
<b>Cyanidin 3-O-sophorosid</b>	Himbeere, rote Johannisbeere, Moltebeere
<b>Cyanidin 3-O-xylosid</b>	Brombeere, schwarze Apfelbeere, Apfel
<b>Cyanidin 3-O-xylosyl-rutinosid</b>	Rote Johannisbeere
<b>Delphinidin 3,5-O-diglucosid</b>	Granatapfel
<b>Delphinidin 3-O-(6"-acetyl-galactosid)</b>	Blaubeere
<b>Delphinidin 3-O-(6"-acetyl-glucosid)</b>	Rotwein, Blaubeere, Weintraube
<b>Delphinidin 3-O-(6"-malonyl-glucosid):</b>	Keine Angaben
<b>Delphinidin 3-O-(6"-p-coumaroyl-glucosid)</b>	Rotwein



<b>Delphinidin 3-O-arabinosid</b>	Blaubeere
<b>Delphinidin 3-O-feruloyl-glucosid</b>	Schwarze Gartenbohne
<b>Delphinidin 3-O-galactosid</b>	Blaubeere
<b>Delphinidin 3-O-glucosid</b>	Himbeere, Johannisbeere, Blaubeere, Weintraube, Granatapfel, schwarze Gartenbohne
<b>Delphinidin 3-O-glucosyl-glucosid</b>	Rote rohe Zwiebel
<b>Delphinidin 3-O-glucosyl-glucosid</b>	Rote rohe Zwiebel
<b>Delphinidin 3-O-rutinosid</b>	Schwarze Johannisbeere
<b>Delphinidin 3-O-sambubiosid</b>	Rote Johannisbeere
<b>Delphinidin 3-O-xylosid</b>	Keine Angaben
<b>Malvidin 3,5-O-diglucosid</b>	Nektarine ungeschält
<b>Malvidin 3-O-(6''-acetyl-galactosid)</b>	Blaubeere
<b>Malvidin 3-O-(6''-acetyl-glucosid)</b>	Rotwein, Blaubeere, Weintraube
<b>Malvidin 3-O-(6''-caffeoyl-glucosid)</b>	Rotwein
<b>Malvidin 3-O-(6''-p-coumaroyl-glucosid)</b>	Rotwein, Weintraube
<b>Malvidin 3-O-arabinosid</b>	Blaubeere
<b>Malvidin 3-O-galactosid</b>	Blaubeere
<b>Malvidin 3-O-glucosid</b>	Rot- und Weißwein, Himbeere, Blaubeere, Weintraube, schwarze Gartenbohne
<b>Pelargonidin</b>	Erdbeere, schwarze Gartenbohne
<b>Pelargonidin 3,5-O-diglucosid</b>	Granatapfel, schwarze Gartenbohne
<b>Pelargonidin 3-O-(6''-malonyl-glucosid)</b>	Erdbeere
<b>Pelargonidin 3-O-(6''-succinyl-glucosid)</b>	Erdbeere
<b>Pelargonidin 3-O-arabinosid</b>	Erdbeere, schwarze Apfelbeere
<b>Pelargonidin 3-O-galactosid</b>	Keine Angaben

<b>Pelargonidin 3-O-glucosid</b>	Himbeere, Erdbeere, Holunderbeere, Granatapfel, schwarze Gartenbohne
<b>Pelargonidin 3-O-glucosyl-rutinosid</b>	Himbeere
<b>Pelargonidin 3-O-rutinosid</b>	Himbeere, Erdbeere, Johannisbeere, süße Kirsche
<b>Pelargonidin 3-O-sambubiosid</b>	Keine Angaben
<b>Pelargonidin 3-O-sophorosid</b>	Himbeere
<b>Peonidin</b>	Rohe schwarze Gartenbohne
<b>Peonidin 3-O-(6"-acetyl-galactosid)</b>	Blaubeere
<b>Peonidin 3-O-(6"-acetyl-glucosid)</b>	Rotwein, Blaubeere
<b>Peonidin 3-O-(6"-malonyl-glucosid)</b>	Keine Angaben
<b>Peonidin 3-O-(6"-p-coumaroyl-glucosid)</b>	Rotwein, Weintraube
<b>Peonidin 3-O-arabinosid</b>	Moosbeere, Blaubeere
<b>Peonidin 3-O-galactosid</b>	Moosbeere, Blaubeere
<b>Peonidin 3-O-glucosid</b>	Rotwein, Weintraube, Moosbeere, Blaubeere, Preiselbeere, Stachelbeere, süße Kirsche, Pflaume
<b>Peonidin 3-O-rutinosid</b>	schwarze Johannisbeere, Stachelbeere, süße und saure Kirsche, Pflaume
<b>Petunidin 3,5-O-diglucosid</b>	Keine Angaben
<b>Petunidin 3-O-(6"-acetyl-galactosid)</b>	Blaubeere
<b>Petunidin 3-O-(6"-acetyl-glucosid)</b>	Rotwein, Blaubeere
<b>Petunidin 3-O-(6"-p-coumaroyl-glucosid)</b>	Rotwein, Weintraube, schwarze Johannisbeere
<b>Petunidin 3-O-arabinosid</b>	Blaubeere
<b>Petunidin 3-O-galactosid</b>	Blaubeere
<b>Petunidin 3-O-glucoside</b>	Rotwein, Weintraube, Blaubeere, schwarze Gartenbohne

<b>Petunidin 3-O-rhamnosid</b>	Keine Angaben
<b>Petunidin 3-O-rutinosid</b>	Schwarze Johannisbeere
<b>Pigment A:</b>	Rotwein
<b>Pinotin A:</b>	Rotwein
<b>Vitisin A:</b>	Rotwein

Quelle: (97)

## Extrakt-Zusammensetzungen

### Anthocyan-Zusammensetzung Dakapo-Extrakt

#### Anthocyan-Zusammensetzung Extraktpulver (berechnet als Cyanidin-3-glucosid)

Substanzen	g/100g
Delphinidin-3-glucosid	2,1
Cyanidin-3-glucosid	0,5
Petunidin-3-glucosid	2,3
Peonidin-3-glucosid	3,5
Malvidin-3-glucosid	10
Delphinidin-3-(6“-OAcetyl)glucosid	0,5
Petunidin-3-(6“-OAcetyl)glucosid	0,5
Peonidin-3-(6“-OAcetyl)glucosid	2,2
Malvidin-3-(6“-OAcetyl)glucosid	0,3
Petunidin-3-rutinosid	1,1
<b>Summe</b>	<b>23,1</b>

### Anthocyan-Zusammensetzung Accent-Extrakt

#### Anthocyane im pulverförmigen Extrakt (Einwaage 1,0 g/l) der Sorte Accent (in mg/l Cyanidin-3-glucosid)

Anthocyane	Accent-Extrakt
Delphinidin-3,5-diglucosid	6,7
Cyanidin-3,5-diglucosid	4,5
Petunidin-3,5-diglucosid	12,6
Delphinidin-3-glucosid	27,3
Peonidin-3,5-diglucosid	25,1
Malvidin-3,5-diglucosid	26,2
Cyanidin-3-glucosid	22,3
Petunidin-3-glucosid	21,1
Peonidin-3-glucosid	20,2
Malvidin-3-glucosid	29,3
Malvidin-3-(6“-O-Acetyl)glucosid	5,2
Cyanidin-3-(6“-O-Acetyl)glucosid	2,2
Petunidin-3-(6“-O-Acetyl)glucosid	5,3
Unbekannt	3,8
Unbekannt	5,8
Unbekannt	2,4
Unbekannt	3,0
<b>Summe</b>	<b>223,1</b>

**Anthocyan-Zusammensetzung Extraktpulver Heidelbeere (\*Berechnet als Cyanidin-3-glucosid)**

Substanzen	g/100g*
Delphinidin-3-galactosid	1,7
Delphinidin-3-glucosid	1,9
Cyanidin-3-galactosid	2,0
Delphinidin-3-arabinosid	1,7
Cyanidin-3-glucosid	2,6
Cyanidin-3-arabinosid	2,7
Petunidin-3-glucosid	1,7
Peonidin-3-galactosid	0,4
Cyanidin-3-glucosid	0,6
Peonidin-3-glucosid	1,5
Malvidin-3-galactosid	0,9
Malvidin-3-glucosid	2,2
Malvidin-3-arabinosid	0,1
<b>Summe</b>	<b>20,0</b>

**Anthocyan-Zusammensetzung Heidelbeere-Dakapo-Extrakt (SP-70)**

Substanzen	mg/l	Bezogen auf Einwaage in mg/g Extrakt	%
Peonidin-3,5-diglucosid	7,4	0,7	0,1
Delphinidin-3-galactosid	15,5	1,5	0,1
Delphinidin-3-glucosid	96,4	9,2	0,9
Peonidin-3,5-diglucosid	21,8	2,1	0,2
Delphinidin-3-arabinosid	14,2	1,4	0,1
Cyanidin-3-glucosid	62,9	6,0	0,6
Cyanidin-3-arabinosid	17,4	1,7	0,2
Petunidin-3-glucosid	103,4	9,9	1,0
Peonidin-3-galactosid	248,9	23,8	2,4
Malvidin-3-glucosid	419,0	40,1	4,0
Malvidin-3-arabinosid	5,4	0,5	0,1
Delphinidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	9,1	0,9	0,1
Petunidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	17,0	1,6	0,2
Peonidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	31,2	3,0	0,3
Malvidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	87,8	8,4	0,8
Peonidin-Derivat (unbekannt)	29,9	2,9	0,3
Malvidin-Derivat (unbekannt)	102,9	9,8	1,0
<b>Summe</b>	<b>1,290,2</b>	<b>123,4</b>	<b>12,3</b>

(Berechnet als Mal3glc)

**Anthocyane im Dakapo-Heidelbeersaft (TH3), -Smoothie (THSm4) und Kontrollgetränk (THPI9) (in mg/L Malvidin-3-glucosid, HPLC/UV, Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)**

<b>Anthocyane</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> Fragment(e)</b>	<b>TH3</b>	<b>THSm4</b>	<b>THPI9</b>
Peonidin-3,5-diglucosid	625 301	5,9	8,0	-
Cyanidin-3,5-diglucosid	611 287	-	4,9	-
Delphinidin-3-galactosid	465 303	9,3	43,1	-
Delphinidin-3-glucosid	465 303	67,4	105,1	-
Cyanidin-3-galactosid/Peonidin-Derivat	449 287/625 301	13,4	30,2	-
Delphinidin-3-arabinosid	435 303	10,9	30,9	-
Cyanidin-3-glucosid	449 287	41,1	58,4	0,2
Petunidin-3-galactosid	479 317	-	11,9	0,3
Cyanidin-3-arabinosid	419 287	12,0	18,6	-
Petunidin-3-glucosid	479 317	69,8	87,0	-
Peonidin-3-galactosid	463 301	-	4,4	0,7
Peonidin-3-glucosid	463 301	165,3	163,2	-
Malvidin-3-glucosid	493 331	273,6	274,7	1,7
Malvidin-3-arabinosid	463 331	4,2	5,5	-
Delphinidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	507 303	5,1	6,5	-
Cyanidin-Derivat	491 287	-	2,5	-
Petunidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	521 317	10,9	8,4	-
Peonidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	505 301	18,3	14,7	-
Malvidin-3-(6"-O-Acetyl)glucosid	535 331	51,7	46,4	2,8
Peonidin-Derivat (unbekannt)	625 301	15,3	12,7	-
Malvidin-Derivat (unbekannt)	639 331	66,6	46,5	3,1
<b>Summe</b>		<b>840,9</b>	<b>983,7</b>	<b>8,9</b>

Analytische Kennzahlen des Traube-Heidelbeersaftes (TH3) bzw. -Smoothies (THSm4) und des dazugehörigen Placebogetränks (THPI9).

**Monosaccharid-Angaben der jeweiligen Säfte**

	<b>Dakapo (A-Saft)</b>	<b>Accent (A-Saft)</b>	<b>Heidelbeere-Dakapo (A-Saft)</b>
<b>Glucose (mg/ml)</b>	75,4	88	84,6
<b>Fructose (mg/ml)</b>	80,7	100	89,2

Angaben zu den Monosaccharid-Konzentrationen, welche in den Zusatzversuchen (2.6) verwendet wurden. Die oben genannten Angaben stammen von Prof. Dr. Dietrich aus der Forschungsanstalt Geisenheim.

**Holunder-Liquid-Extrakt (Zusammensetzung)**

	<b>Holunderbeere</b>		<b>Holunderbeere-Liquid 3,2 % (V0120005)</b>	
<b>Anthocyane</b>	<b>MW [mg/g]</b>	<b>Stabw [mg/g]</b>	<b>MW [mg/g]</b>	<b>Stabw [mg/g]</b>
Cyanidin-3-Glucosid (MW 448)	9,311	1,411	28,843	0,318
Cyanidin-3,5-Diglucosid (MW 610)	0,025	0,002	0,219	0,001
Cyanidin-3-Sambubiosid (MW 580)	11,634	1,048	31,390	0,572
Cyanidin-3-Rutinosid (MW 594)	0,159	0,018	1,099	0,031
Cyanidin-3-Sambubiosid-5-Glucosid (MW 742)	2,430	0,246	10,610	0,223
Perlagonidin-3-Glucosid (MW 432)	0,243	0,010	1,307	0,028
Perlagonidin-3-Sambubiosid (MW 564)	0,066	0,006	1,114	0,030
<b>Gesamt</b>	<b>23,87</b>		<b>74,58</b>	
<b>Weitere Polyphenole</b>	<b>MW [mg/g]</b>	<b>Stabw [mg/g]</b>	<b>MW [mg/g]</b>	<b>Stabw [mg/g]</b>
Quercetin (MW 302)	0,068	0,008	1,257	0,106
Rutin (MW 610)	6,523	0,435	24,114	0,975
Quercetin-Galactosid (MW 464)	0,036	0,006	0,477	0,021
Quercetin-Glucosid (MW 464)	0,855	0,078	10,658	0,522
Chlorogensäure (MW 354)	5,691	0,068	21,326	1,762
<b>Gesamt</b>	<b>13,17</b>		<b>57,83</b>	

## Ernährungsprotokoll

### Welche Lebensmittel sind während der Studie prinzipiell erlaubt?

<b>Fleisch, Wurst, Fisch</b> Alle Fleischsorten und Fleischwaren (außer mariniertes Fleisch mit Paprikapulver u. ä.)  Alle Wurst und Wurstwaren (außer Paprikawurst, Peperonisalami u. ä.)  Fisch, Krusten- und Weichtiere (außer Fischwaren in Tomatensoße u. ä.)	<b>Milch, Milchprodukte, Käse, Eier</b> Milch, Joghurt und andere Milchprodukte (ohne Müsli/Obst/Kakao/Nüsse u. ä.)  Quark und Käse (ohne Obst/Tomaten/Paprika/Nüsse u. ä.)  Eier	<b>Gemüse</b> Grüne Blattsalate, Gurken, Zucchini, Fenchel, grüne Bohnen, Erbsen, Sellerie, Kohlrabi, Pilze  <b>Obst</b> s. nächste Seite!
<b>Beilagen und Brot</b> Nudeln, Reis, etc., Kartoffeln und -produkte, Brot, Bötchen (kein Vollkorn)	<b>Fette, Gewürze u. ä.</b> Tierische Fette, Salz/Pfeffer, Heller Essig, Kräuter, Knoblauch, Senf, Mayonnaise	<b>Süßigkeiten u. ä.</b> Kekse, Kuchen (kein Vollkorn, ohne dunkle Schokolade/rote Früchte) Salzgebäck, Kracker (kein Vollkorn) Weiße Schokolade, Zucker, Honig, Eis (ohne Obst, dunkle Schokolade/Nüsse u. ä.), Kaugummi

### Hinweis zu Getränken:

#### Ohne Einschränkungen sind erlaubt:

- Wasser (still oder mit Kohlensäure)
- Wasser mit Aroma
- Aufgussgetränke (Kamille, Kräuter, Brennnessel, Fenchel, Pfefferminze)
- Kaffee-Ersatz, z. B. Caro-Kaffee
- Limonaden (außer z. B. rote Bionade)



**Welche Lebensmittel sind während der Studie eingeschränkt erlaubt?**

<b>Milch, Milchprodukte</b> Milch, Joghurt und andere Milchprodukte mit Obst, Nüssen u. ä. (ohne rote Früchte)	<b>Gemüse</b> Gelbe und grüne Paprika, Porree, Spinat, Blumenkohl, Broccoli, Zwiebeln (keine roten Zwiebeln)	<b>Obst</b> Bananen, Birnen, Helle Trauben, Äpfel (max. 1 Stück/Tag), Pfirsiche, Aprikosen (max. 1 Stück/Tag), Kiwis, Ananas
<b>Backwaren und Cerealien</b> Frühstückscerealien (kein Vollkorn/ohne rote Früchte/dunkle Schokolade/Kleie)	<b>Fette, Gewürze</b> Pflanzliche Fette und Öle, Paprikapulver, Chilipulver, Cayennepfeffer, Currypulver	<b>Süßigkeiten u. ä.</b> Helle Schokolade (mit niedrigem Kakaoanteil) Eis mit Obst, Nüssen ü. ä. (ohne rote Früchte/dunkle Schokolade) Nüsse Marmelade/Gelee (ohne rote Früchte)

- Obst und Gemüse wenn möglich vor dem Verzehr schälen, v. a. wenn mehrere Portionen pro Tag verzehrt werden; auf rote Früchte (siehe nächste Seite) verzichten
- Äußere Blätter bei Salaten möglichst nicht verzehren
- Bei Getreideprodukten auf Vollkornprodukte verzichten
- Aufgeführte Gewürze und ähnlich Gewürzmischungen sparsam verwenden

**Hinweis zu Getränken:****Bitte meiden Sie:**

- Schwarzen Tee, Grünen oder weißen Tee, Früchtetee, Rooibos Tee
- Kaffee
- Alkoholische Getränke (Bier, Wein, Schnaps, Likör)

**Pro Tag sind erlaubt:**

1 Tasse Tee **ODER** 1 Tasse Kaffee **ODER** 1 Glas Bier **ODER** 1 Glas Weißwein  
 (KEIN Rotwein!!!)

**Bitte verzichten Sie auf die folgenden Lebensmittel:**

**Produkte, die Anthocyane (rot-blau-violette Farbstoffe) enthalten, zum Beispiel:**

<b>Beeren</b> Blaubeeren, Brombeeren, Cranberries, Erdbeeren, Heidelbeeren, Himbeeren, Johannesbeeren, Preiselbeeren	<b>Weitere Obstsorten</b> Kirschen, rote Trauben, Granatapfel, Pflaumen, Zwetschgen, Wassermelone	<b>Fruchtzubereitungen, Kuchen, Süßigkeiten u. ä.</b> Rote Marmelade/Gelees, Kuchen, Joghurts, Eis, Desserts mit roten Früchten, Müsli, Müsliriegel, Vollkorn- Cerealien, dunkle Schokolade, Kakaopulver, Gummibonbon mit Frucht
<b>Gemüse</b> Blau-violette Kartoffeln, Möhren, Tomaten, rote und orange Paprika, Rotkohl, rote Beete, Radicchio, Radieschen, Rhabarber, rote und schwarze Hülsenfrüchte (Kidney-Bohnen, rote Linsen, ...), Auberginen, Kürbis, rote Zwiebeln	<b>Sonstiges</b> Tomatensoße, -püree, -mark, Ketchup, rotes Pesto, Sojaprodukte	Anthocyane sind als Lebensmittelzusatzstoff unter der Nummer <b>E 163</b> zugelassen → <b>Zutatenliste beachten!</b>

**Hinweis zu Getränken:**

**Bitte verzichten Sie auf:**

- Rotwein
- Obstsäfte, -schorlen
- Smoothies und Gemüsesäfte

Diese Liste erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit.  
 Bitte achten Sie deshalb auch selbst beim Einkauf und Verzehr von Lebensmitteln  
 darauf, ob nicht eventuell anthocyanreiches Obst oder Gemüse enthalten sind.

**Verzichten Sie unbedingt auch auf Nahrungsergänzungsmittel  
 (Multivitaminbrausen, Vitaminpräparate, usw.)!**

JUSTUS-LIEBIG-  
UNIVERSITÄT  
GIESSEN

**E. Domann, N. Würdemann, F. Glowatzki, A.-K. Karaalp, T. Chakraborty**  
**Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen**

1. Dommann E, Hong G, Imziriloglu C, Turschner S, Kühle J, Walzel C, Hain T, Hossain H, and Chakraborty T. 2003. Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 41:5500-5510.
2. Imziriloglu C, Dahmen H, Hain T, Billion A, Kuenne C, Chakraborty T, and Dommann E. 2011. Highly specific and quick detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces and gut tissue of cattle and humans by multiple real-time PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 49:1843-1852.
3. Imziriloglu C, Hain T, Chakraborty T, and Dommann E. 2008. Hidden pathogens uncovered: metagenomic analysis of urinary tract infections. *Andrologia* 40:66-71.
4. Imziriloglu C, Soydan N, Schäfer M, Bretzel RG, Chakraborty T, and Dommann E. 2006. Diagnosis of mixed *Pleiomocium* malariae and *Brucella* infection in a renal transplant adult volunteer by examination bone-marrow specimens by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44:2307-2310.
5. Krawitz C, Abu Mrhail M, Stein M, Imziriloglu C, Dommann E, Pleschka S, and Hain T. 2011. Inhibitory activity of standardised black elderberry extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *BMC Complement Alternat. Med.* 16:21(11):116.

Nutrients. 2016 Jul 2;8(7). pii: E411. doi: 10.3390/nu8070411.

## **Inhibition of Low-Grade Inflammation by Anthocyanins after Microbial Fermentation in Vitro.**

Kuntz S<sup>1</sup>, Kunz C<sup>2</sup>, Domann E<sup>3</sup>, Würdemann N<sup>4</sup>, Unger F<sup>5</sup>, Römpp A<sup>6,7</sup>, Rudloff S<sup>8</sup>.

### **Abstract**

The anti-inflammatory effects of anthocyanins (ACNs) on vascular functions are discussed controversially because of their low bioavailability. This study was performed to determine whether microorganism (MO)-fermented ACNs influence vascular inflammation in vitro. Therefore, MO growth media were supplemented with an ACN-rich grape/berry extract and growth responses of *Escherichia coli*, *E. faecalis* and *H. alvei*, as well as ACN fermentation were observed. MO supernatants were used for measuring the anti-inflammatory effect of MO-fermented ACNs in an epithelial-endothelial co-culture transwell system. After basolateral enrichment (240 min), endothelial cells were stimulated immediately or after 20 h with TNF- $\alpha$ . Afterwards, leukocyte adhesion, expression of adhesion molecules and cytokine release were measured. Results indicate that *E. coli*, *E. faecalis* and *H. alvei* utilized ACNs differentially concomitant with different anti-inflammatory effects. Whereas *E. coli* utilized ACNs completely, no anti-inflammatory effects of fermented ACNs were observed on activated endothelial cells. In contrast, ACN metabolites generated by *E. faecalis* and *H. alvei* significantly attenuated low-grade stimulated leukocyte adhesion, the expression of adhesion molecules E-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 and cytokine secretion (IL-8 and IL-6), as well as NF- $\kappa$ B mRNA expression with a more pronounced effect of *E. faecalis* than *H. alvei*. Thus, MO-fermented ACNs have the potential to reduce inflammation.

### **KEYWORDS:**

anthocyanins; fermentation; grapes and berries; in vitro co-culture model; low-grade inflammation

PMID: [27384582](#); PMCID: [PMC4963887](#); DOI: [10.3390/nu8070411](#)

## Tecan-Schemata

**Tecan-Schema 1: Testung verschiedener Anthocyane und Monosaccharide an *Enterococcus faecalis* (Ent. f.) V583**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	TSB	TSB	TSB+ Ent. f. V583	TSB+ Ent. f. V583	TSB+ Ent. f. V583			TSB	TSB	TSB+ Ent. f. V583	TSB+ Ent. f. V583	TSB+ Ent. f. V583	<b>A</b>
<b>B</b>	TSB+ Dakapo	TSB+ Dakapo	TSB + ←	Ent. f. V583 + —	Dakapo →			TSB+ Dakapo- MS	TSB+ Dakapo- MS	TSB + ←	Ent. f. V583 + —	Dakapo- MS →	<b>B</b>
<b>C</b>	TSB+ Accent	TSB+ Accent	TSB + ←	Ent. f. V583 + —	Accent →			TSB+ Accent- MS	TSB+ Accent- MS	TSB + ←	Ent. f. V583 + —	Accent- MS →	<b>C</b>
<b>D</b>	TSB+ HD	TSB+ HD	TSB + ←	Ent. f. V583 + —	HD →			TSB+ HD- MS	TSB+ HD- MS	TSB + ←	Ent. f. V583 + —	HD- MS →	<b>D</b>
<b>E</b>	TSB+ Heidel- beere	TSB+ Heidel- beere	TSB + ←	Ent. f. V583 + —	Heidel- beere →								<b>E</b>
<b>F</b>	TSB+ Holunder	TSB+ Holunder	TSB + ←	Ent. f. V583 + —	Holunder →								<b>F</b>
<b>G</b>													<b>G</b>
<b>H</b>													<b>H</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	

TSB = 200 µl, TSB + Bakterium = 190 µl + 10 µl, TSB + Anthocyan = 180 µl + 20 µl, TSB + Anthocyan + Bakterium = 170 µl + 20 µl + 10 µl. TSB = 200 µl, TSB + Bakterium = 190 µl + 10 µl, TSB + MS-Saft = 180 µl + 20 µl, TSB + MS-Saft + Bakterium = 170 µl + 20 µl + 10 µl

**Tecan-Schema 2: Testung verschiedener Anthocyan-Konzentrationen an *Enterococcus faecalis* (Ent. f.) V583**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	TSB	TSB	TSB+ <i>Ent. f.</i> V583	TSB+ <i>Ent. f.</i> V583	TSB+ <i>Ent. f.</i> V583		TSB+ Dakapo 88 µM	TSB+ Dakapo 88 µM	TSB + ←	<i>Ent. f.</i> V583 + —	Dakapo 88 µM →		<b>A</b>
<b>B</b>	TSB+ Dakapo 11 µM	TSB+ Dakapo 11 µM	TSB + ←	<i>Ent. f.</i> V583 + —	Dakapo 11 µM →								<b>B</b>
<b>C</b>	TSB+ Dakapo 22 µM	TSB+ Dakapo 22 µM	TSB + ←	<i>Ent. f.</i> V583 + —	Dakapo 22 µM →								<b>C</b>
<b>D</b>	TSB+ Dakapo 33 µM	TSB+ Dakapo 33 µM	TSB + ←	<i>Ent. f.</i> V583 + —	Dakapo 33 µM →								<b>D</b>
<b>E</b>	TSB+ Dakapo 44 µM	TSB+ Dakapo 44 µM	TSB + ←	<i>Ent. f.</i> V583 + —	Dakapo 44 µM →								<b>E</b>
<b>F</b>	TSB+ Dakapo 55 µM	TSB+ Dakapo 55 µM	TSB + ←	<i>Ent. f.</i> V583 + —	Dakapo 55 µM →								<b>F</b>
<b>G</b>	TSB+ Dakapo 66 µM	TSB+ Dakapo 66 µM	TSB + ←	<i>Ent. f.</i> V583 + —	Dakapo 66 µM →								<b>G</b>
<b>H</b>	TSB+ Dakapo 77 µM	TSB+ Dakapo 77 µM	TSB + ←	<i>Ent. f.</i> V583 + —	Dakapo 77 µM →								<b>H</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	

**TSB** = 200 µl, **TSB + Bakterium** = 190 µl + 10 µl, **TSB + Anthocyan** = siehe Tabelle 2.5-1, **TSB + Anthocyan + Bakterium** = siehe Tabelle 2.5-1.

## Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Domann für die entgegengebrachte Unterstützung bezüglich der Dissertation sowie für Vermittlung der Begeisterung gegenüber der Wissenschaft und damit verbundenen Motivation danken und dass er es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Danken möchte ich Ihm auch dafür, dass er, trotz vieler Termine, sich immer Zeit für Fragen und Problembesprechungen genommen hat.

Ohne die exzellente Betreuung und das sehr gute Arbeitsklima wäre es mir nicht möglich gewesen, die Arbeit zum Abschluss zu bringen.

Silke Zechel-Gran möchte ich für die Einarbeitung in die unterschiedlichen Methoden und die Laborarbeit im Allgemeinen danken. Mit ihrer Erfahrung, konstruktiver Kritik und ihren Ideen hat sie mich jederzeit unterstützt und weiter voran gebracht.

Den Kollegen im Institut möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit, die motivierende Stimmung und die jederzeit bestehende Hilfsbereitschaft danken.

Besonderen Dank geht an Dr. Lea Herges und Silke Zechel-Gran für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Dietrich möchte ich für die Bereitstellung der anthocyanhaltigen Beerenextrakte danken sowie Bettina Fröhling für die Bereitstellung der Informationen bezüglich der Extrakte.

Frau Dr. Sabine Kuntz möchte ich danken, dass sie mir bezüglich ernährungswissenschaftlicher Fragen stets eine sehr kompetente und hilfsbereite Ansprechpartnerin war und mir viele Materialien zur Verfügung gestellt hat.

Weiter möchte ich den Probandinnen für die Teilnahme an der Interventionsstudie danken.

Ein weiterer Dank gilt auch dem BMBF für die finanzielle Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für die unermüdliche Unterstützung während dieser Arbeit und in der Zeit meines gesamten Studiums.



